

SÉRIE A, N° 3156
N° D'ORDRE :
4028

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude MARTIN

1^{re} THÈSE

ÉTUDE DE QUELQUES DÉVIATIONS
DE MÉTABOLISME CHEZ LES PLANTES
ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 10 juin 1958, devant la Commission d'examen :

MM. GAUTHERET *Président.*

LEDERER }
M^{me} CHAIX } *Examineurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

7, rue Keppler - Paris

Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A, N° 3156

N° D'ORDRE :

4028

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude MARTIN

1^{re} THÈSE

ÉTUDE DE QUELQUES DÉVIATIONS
DE MÉTABOLISME CHEZ LES PLANTES
ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 10 juin 1958, devant la Commission d'examen :

MM. GAUTHERET *Président.*

LEDERER
M^{me} CHAIX } *Examineurs.*



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

7, rue Keppeler - Paris

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS.

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.
PAUTHENIER	T	Électrotechnique générale.
De BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.
LAUGIER	T	Physiologie générale.
M. CURIE	T	Physique (S. P. C. N.).
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
PLANTEFOL	T	Botanique.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Mécanique générale.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S. P. C. N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique.
EPHROSSI	T	Génétique.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P. C. B.).
LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
M. MORAND	T	Enseignement de physique.
SOLEILLET	T	Physique.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Biologie végétale (P. C. B.).
De CUGNAC	T	Biologie végétale (P. C. B.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HÉRITIÉRE	T	Génétique.
GRIVET	T	Radioélectricité.
PONCIN	T	Mécanique des fluides.
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste.
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
M. PRUVOST	T	Géologie.
AMIEL	T	Chimie générale (P. C. B.).

PROFESSEURS

HOCART	T	Minéralogie.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (P. C. B.).
COUTEAUX	T	Biologie animale (P. C. B.).
MAY	T	Biologie animale (P. C. B.).
CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.
FELDMANN	T	Biologie (P. C. B.).
GUINIER	T	Physique générale (P. C. B.).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités.
SCHWARTZ	T	Méthodes mathématiques de la physique.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation.
BRÉLOT	T	Calcul différentiel.
NORMANT	T	Chimie organique.
BÉNARD	T	Chimie (P. C. B.).
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGÉ	T	Statistiques mathématiques.
GELOSO	T	Chimie (S. P. C. N.).
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
DESTRIAU	T	Physique (M. P. C.).
Mlle LE BRETON	T	Physiologie générale.
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Mathématiques générales.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. P. C.).
PISOT	T	Calcul des probabilités.
E. ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
JOLIOT	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
LENNUIER	T	Physique (P. C. B.).
RIZET	T	Génétique.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Théories physiques.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Physique (P. C. B.).
BRUSSET	T	Chimie minérale.
M. LÉVY	T	Physique théorique.
LENORMANT	T	Physiologie.
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (P. C. B.).
PIAUX	T	Chimie (P. C. B.).
BRUN	T	Mécanique expérimentale des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
Mme DUBREIL	T	Mathématiques.
Mme LELONG	T	Mathématiques (E. N. S.).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique (M. P. C.).
J.-E. DUBOIS	T	Chimie (S. P. C. N.).
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
MICHEL	T	Chimie (S. P. C. N.).
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT	T	Physique (Enseignement).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Biologie animale (P. C. B.).
CAMUS	T	Biologie végétale (P. C. B.).
CASTAING	T	Physique générale.
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie végétale.
NOIROT	T	Évolution des êtres organisés.
PANNETIER	T	Chimie (P. C. B.).
POSSOMES	T	Biologie animale (P. C. B.).
PULLMANN	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique.
VILLE	T	Économétrie.
WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).

Secrétaire général..... C. MONIER.

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE DE QUELQUES DÉVIATIONS
DE MÉTABOLISME CHEZ LES PLANTES
ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS

normales du cytoplasme (WILDMANN, 1949) (87), ou encore l'accumulation dans les tissus, au cours de la maladie, de certains produits : sucres, glutamine, etc... ou même les troubles que cette dernière apporte aux grandes fonctions de la cellule végétale, comme la photosynthèse ou la respiration.

Nous avons nous-même été frappé par les différences considérables que l'on peut observer lorsqu'on broie des tissus provenant de plantes saines et de plantes malades ; ces derniers, en effet, brunissent à l'air extrêmement rapidement et d'une manière beaucoup plus intense que ceux des plantes saines. Nous avons rencontré ce phénomène chez un grand nombre de plantes : Dahlia, Tabac, Pomme de terre, Dactyle, etc.

Nous avons donc commencé à étudier en détail, chez les plantes malades, l'activité des enzymes responsables de ces oxydations anormales, ainsi que leurs substrats naturels et plus spécialement ceux de la polyphénoloxydase.

Ce dernier point nous a conduit à étudier l'accumulation de certains glucosides de ces phénols qui présentent une fluorescence particulière.

Nous avons également été amené à étudier l'accumulation de substrats et les activités enzymatiques en fonction du temps au cours de l'évolution de la maladie et nous avons constaté alors, que ces phénomènes vont de pair avec des troubles de la synthèse des anthocyanes.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous voudrions exprimer notre plus vive gratitude à M. G. MOREL, dans le laboratoire duquel ce travail a été réalisé. Les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer et sa compétence en matière de chimie organique nous ont permis de résoudre avec les moindres difficultés les nombreux problèmes qu'a soulevés ce travail. Qu'il soit assuré de notre plus profonde reconnaissance.

Nos bien vifs remerciements auraient été aussi à Monsieur le Professeur FROMAGEOT pour l'honneur qu'il nous avait fait d'accepter la présidence de notre jury. Nous sommes sincèrement peinés à la pensée que son décès brutal nous empêche de le voir désormais parmi nous.

Que Madame et Messieurs les Professeurs CHAIX, GAUTHERET et LEDERER soient assurés de notre gratitude pour l'honneur qu'ils nous ont fait en constituant notre jury.

Nous tenons à associer à ces remerciements M. LIMASSET, ancien Directeur de la Station Centrale de Pathologie Végétale à Versailles qui a guidé nos premiers pas dans le domaine de la Virologie, et M. DARPoux, actuel Directeur, qui nous a laissé entière liberté pour la réalisation de ce travail, dans le cadre de l'I. N. R. A.

Nous n'oublierons pas enfin nos camarades de laboratoire, nos amis et nos collègues, dont l'amitié nous a été précieuse, et tout particulièrement M. J. QUEMENER qui de plus, nous apporta une aide précieuse dans l'application pratique de nos résultats.

HISTORIQUE

Les premiers travaux sur l'activité des oxydases chez les plantes atteintes de virus sont très anciens et ont débuté bien avant que la nature de ces maladies soit connue.

Le terme « oxydase » fut employé pour la première fois par BERTRAND en 1896 (8) à la suite de ses travaux sur l'oxydation des jus de *Russula nigricans*. De très nombreux travaux ont été réalisés depuis (BACH et CHODAT, 1905 (3), WHELDAL-ONSLOW, 1912 (85), RAPER, 1927 (66), etc. les ayant résumés à différentes époques); il en résulte une certaine confusion dans la littérature et il a fallu attendre les travaux de KUBOWITZ, 1938 (43 et 44) et de KEILIN et MANN (1937) pour faire le point dans ce domaine.

On considère actuellement, pour les oxydases, que c'est l'oxygène moléculaire qui sert d'accepteur d'électrons. Ces oxydases activent la molécule d'oxygène O_2 ; cette activation permet à l'oxygène d'accepter l'hydrogène (électrons) pour former de l'eau. Il n'est pas possible de détecter la production d'eau oxygénée au cours de cette réaction.

Ainsi, au cours de l'oxydation d'un substrat, ce sont les oxydases qui contrôlent l'étape finale, c'est-à-dire la réduction de l'oxygène, par un transfert d'électrons.

Les peroxydases, elles, catalysent l'oxydation de substrats par l'eau oxygénée.

Bien que ces enzymes à fer soient largement répandues chez les plantes, leur rôle et leur importance dans les phénomènes respiratoires n'ont jamais pu être bien définis.

Or, il est curieux de constater que les premiers travaux sur les phénomènes d'oxydation, chez les plantes atteintes de maladies à virus, sont contemporains de ceux relatifs aux enzymes responsables de ces oxydations. C'est ainsi que WOODS, en 1899 (89), 1900 (90) et 1902 (91) montre, pour la première fois, que « l'oxygénase » et la peroxydase étaient plus actives dans les feuilles de Tabac atteintes du virus de la mosaïque que dans les feuilles saines. Il remarque, d'autre part, que l'accroissement de l'activité oxydasique est localisée dans les taches vert clair des feuilles mosaïquées; par la suite, il met en évidence l'accumulation d'amidon dans ces mêmes taches et l'attribue à l'inhibition de l'activité de l'amylase par les oxydases.

SUZUKI (1902), (77, 78), SHIBATA (1903) (71) avec une maladie du Mûrier très répandue au Japon (le Mulberry dwarf disease), PANTANELLI (61) en 1912, chez la Vigne, BUNZEL (1912 (15,16) et 1913 (17, 18)) chez la Betterave atteinte de curly-top, CHAPMAN (1917) (22) chez le Tabac et la Tomate atteints de mosaïque, BUNZEL (1914) (19) et NEGER

(1919) (57) chez la Pomme de terre hébergeant le virus de l'enroulement, montrent tous que ces plantes atteintes de leurs maladies à virus respectives accusent une activité beaucoup plus élevée de l'oxygénase et de la peroxydase.

En dépit de tous ces travaux, quelques auteurs doutent de l'influence des maladies à virus sur l'activité de ces enzymes ; il en est ainsi pour HUNGER en 1903 (39) et 1905 (40) et DOBY (1911) (25,26). Mais signalons que DOBY travaillait avec le virus de l'enroulement sur des tubercules de Pommes de terre, c'est-à-dire avec un organe dans lequel la synthèse du virus est pratiquement nulle.

Plus récemment, c'est l'étude des échanges respiratoires chez les plantes malades qui a attiré l'attention des physiologistes. C'est ainsi que DUNLAP (1930) (27) et CALDWELL (1934) (20) travaillant respectivement sur le Tabac et la Tomate hébergeant le virus de la mosaïque du Tabac, trouvent que la quantité de CO_2 dégagé par les plantes malades est très supérieure à celle que dégagent les plantes saines. CALDWELL attribue, sans le démontrer, cet accroissement de respiration à une plus grande activité des oxydases. Puis THUNG (1928) (84) et WHITEHEAD (1934) (86) trouvent que la respiration des Pommes de terre atteintes du virus de l'enroulement est nettement supérieure à celle des plantes saines. Ils concluent tous deux que cet accroissement du quotient respiratoire est dû à l'accumulation dans les tissus des plantes malades de substrats (glucose, fructose, saccharose), phénomène bien connu chez les maladies à virus du type jaunisse.

WOODS et DU BUY (1942) (92) concluent que l'infection du Tabac par le virus de la mosaïque du Tabac provoque l'inhibition d'un système A (cyano-sensible) ; un système B (également cyano-sensible) n'est pas affecté ; mais un système C (cyano-résistant) présente une activité considérablement accrue. TAKAHASHI, en 1947 (79), ne peut confirmer ces résultats et ne peut mettre en évidence aucune différence entre les effets du cyanure sur la respiration des plantes saines et des plantes malades.

Enfin, WYND, en 1942 (93) remarque que le taux d'oxygène utilisé par les feuilles de Tabac atteintes du virus de la mosaïque est grandement accru pendant les quatre jours qui suivent l'inoculation de la feuille la plus basse. La période de stimulation de l'absorption d'oxygène précède environ de 10 jours l'apparition générale du virus à des concentrations infectieuses.

En 1943, WYND (94) étend ses travaux aux systèmes enzymatiques. Il travaille avec le virus de la mosaïque du Tabac sur *Nicotiana Tabacum* var. White Burley, et détermine l'activité de l'« oxygénase » et de la peroxydase par la méthode de GUTHRIE (1931) (35) qui consiste à oxyder une solution d' α -naphthol et de paraphénylène diamine à pH 4,5 ; on extrait ensuite le colorant par du toluène et on mesure l'absorption au

photocolorimètre. WYND donne alors comme définition du terme « oxygénase » : « L'oxygénase est l'enzyme catalysant l'oxydation de certaines substances polyphénoliques par la molécule d'oxygène avec formation de quinones et de peroxydes. » (WYND, 1943, p. 650) (94). Il s'agit donc bien de ce que l'on appelle maintenant la tyrosinase ou encore la polyphénol-oxydase.

WYND montre ainsi que l'activité de l'oxygénase (polyphénol-oxydase) est plus élevée dans les premiers jours suivant l'infection, puis diminue vers le 5^e ou 6^e jour, pour marquer un nouveau maximum vers le 14^e jour après l'infection, c'est-à-dire au moment de l'apparition des symptômes. L'activité de la peroxydase est peu affectée ; quant à la catalase, elle montre un maximum d'activité les 8^e et 16^e jours suivant l'infection. WYND en conclut que la physiologie des feuilles est affectée avant qu'elles ne contiennent des taux détectables de virus.

BAWDEN, en 1950 (6), sans mettre en doute le travail de WYND, écrit que ces résultats n'ont pas encore été confirmés et qu'il faut attendre de nouveaux travaux dans ce domaine avant de pouvoir en tirer des conclusions.

Tels sont, brièvement résumés, les principaux travaux concernant l'activité des enzymes responsables d'oxydation chez les plantes atteintes de maladies à virus.

L'accumulation de substrats de ces enzymes ou de substances analogues n'a fait, à notre connaissance, l'objet d'aucun travail détaillé dans le cas particulier des maladies à virus. Seul, BEST, en 1953 (11) dans une revue très générale, signale qu'il peut y avoir accumulation de « tannins » chez les plantes malades.

Quant à l'accumulation de composés fluorescents chez les plantes atteintes de maladies à virus, on doit les premiers travaux à BEST qui, en 1936 (9), met en évidence, chez la Tomate atteinte de Spotted-Wilt et le *Nicotiana Glutinosa* présentant des lésions locales de mosaïque du Tabac, une substance hydrosoluble qu'il identifie, en 1944 (10) comme étant la scopolétine. Il établit, de plus, que la quantité de scopolétine est directement proportionnelle à la quantité de virus et émet l'hypothèse que le virus rompt une chaîne de réactions dans laquelle la scopolétine est normalement un produit intermédiaire. ANDREAE (1949) (1) attribue également la fluorescence des tubercules de Pommes de terre atteints d'enroulement à la scopolétine.

L'altération du métabolisme des anthocyanes n'a fait l'objet que d'observations ou d'utilisations pratiques ; en effet, nombre de maladies à virus provoquent une panachure des fleurs, qui a parfois été utilisée dans un but commercial ; l'exemple le mieux connu est certainement celui de la Tulipe : c'est ainsi que la variété Rembrandt (à fleurs panachées) n'est qu'une forme malade de la variété Princesse Elizabeth. Mais ce

« breaking », comme disent les Anglo-Saxons, n'est pas spécial à la Tulipe. La giroflée atteinte du virus du « ring-spot » du Chou présente une panachure sur fond jaune. La Pensée, le Delphinium, le Glaïeul, l'Anémone, le Tabac, etc. ont également des fleurs panachées lorsque ces plantes hébergent leurs virus respectifs. Ces symptômes, cependant très spectaculaires, ont été pratiquement négligés des virologues et ont même été parfois étudiés comme étant un caractère génétique (cas du Delphinium, cité par MARKHAM (1957) (48). A notre connaissance, aucun travail fondamental n'a été tenté dans cette voie.

III. — MATÉRIEL

La grande diversité des symptômes causés par les maladies à virus des plantes montre à quel point les déviations du métabolisme peuvent être variées, suivant la nature du virus. D'autre part, un même virus, inoculé à des hôtes différents, peut provoquer des réactions entièrement différentes; c'est ainsi que la mosaïque du Tabac se généralise chez le *Nicotiana Tabacum* et le *Lycopersicum esculentum* en provoquant chez ces plantes une mosaïque relativement légère, alors qu'inoculée au *Nicotiana Glutinosa* elle provoque l'apparition de lésions locales qui deviennent rapidement nécrotiques, entraînant la mort de la feuille entière si l'inoculum est assez concentré. Le virus Y largement répandu chez la plupart des variétés de Pommes de terre peut aussi provoquer chez ces plantes des réactions très différentes : chez la variété Arran Victory, il ne cause qu'une légère mosaïque alors qu'après inoculation à la variété Majestic on constate une très forte nécrose du sommet des tiges, qui peut entraîner la mort de la plante. Il existe des milliers d'exemples analogues, mais la nature de la plante n'est pas la seule cause de la variabilité des symptômes, donc des déviations de métabolisme imposées par le virus. La lumière, la température, l'humidité, la nutrition, jouent aussi un très grand rôle dans l'extériorisation des symptômes.

On a naturellement classé les différents virus d'après les symptômes qu'ils provoquent et certains virologistes ont cherché à étayer cette classification par des travaux d'ordre biochimique et physiologique, d'ailleurs souvent contradictoires. En se basant sur le rapport :

$$\frac{C \text{ des glucides}}{N \text{ des protéines}}$$

on peut diviser les maladies à virus des plantes en deux catégories :

— les maladies à virus du type « mosaïque » pour lesquelles ce rapport passe de 1 en moyenne chez les plantes saines à 0,5-0,6 chez les plantes malades, dans les cas extrêmes ;

— les maladies à virus du type « jaunisse » pour lesquelles ce rapport peut atteindre 3 chez les plantes malades.

Ceci n'est d'ailleurs pas la seule différence qui existe entre ces deux types de maladies ; en dehors de ce rapport $\frac{C}{N}$, il existe un certain nombre d'autres différences : c'est ainsi que :

— Un grand nombre de virus type « mosaïque » ont été isolés, chimiquement purifiés et parfois même cristallisés et il est maintenant bien établi qu'il s'agit de nucléoprotéines. Il n'en est pas de même des virus type « Jaunisse » ; en effet, on n'a pas réussi, jusqu'à ce jour, à notre connaissance, à purifier ou cristalliser un virus de ce groupe.

— D'autre part, dans une grande majorité, les virus du type « Mosaïque » se transmettent aisément par voie mécanique, tandis que pour inoculer les virus « Jaunisse », on se trouve dans l'obligation de passer par l'intermédiaire d'un insecte vecteur ; les transmissions mécaniques de ce type de virus n'ont été réalisées, jusqu'à présent, qu'avec un pourcentage de réussite extrêmement faible.

— Il y a accumulation de sucres réducteurs (glucose, fructose) chez les plantes atteintes de virus du type « Jaunisse » mais diminution des quantités de ces corps chez les plantes atteintes de « mosaïque ».

Nous avons insisté sur ces points particuliers, car nous tenons à préciser que les travaux exposés dans ce mémoire n'ont trait qu'à des virus du type « Mosaïque » et qu'ils ne sont pas, à priori, transposables à des virus du type « Jaunisse ».

Les principaux virus étudiés furent :

— la mosaïque du Tabac, sur :

Nicotiana Tabacum, var. Samson.

Nicotiana glutinosa.

Lycopersicum esculentum.

— les virus X, Y et A de la Pomme de terre, sur :

Nicotiana Tabacum.

Nicotiana glutinosa.

Solanum tuberosum.

Quelques travaux ont été réalisés avec le *Dahlia variabilis*, hébergeant trois virus :

— la mosaïque du Dahlia,

— la mosaïque du Concombre,

— le Spotted-Wilt (maladie bronzée de la Tomate).

Enfin, nous avons eu l'occasion de vérifier accessoirement quelques-uns de nos résultats sur des plantes très diverses, telles que l'Hortensia, le Chrysanthème, le Dactyle, etc.

IV. — TECHNIQUES

I. — TECHNIQUES DE VIROLOGIE

1^o Transmission.

Lorsqu'on veut inoculer expérimentalement un virus à une plante, on a le choix entre plusieurs techniques.

On peut tout d'abord greffer un fragment d'une plante malade sur la plante à inoculer : tige, bourgeon, fragment de limbe foliaire ou de péricarpe de fruit. Lorsque les deux espèces sont très différentes et que la greffe n'est pas possible, on peut utiliser comme intermédiaire une plante parasite se développant sur les deux espèces, généralement la *Cuscuta*.

On peut également inoculer la plante directement, en introduisant une certaine quantité d'une suspension de virus à l'intérieur des cellules épidermiques d'une feuille ; c'est ce qu'on appelle : transmission par voie mécanique.

On peut enfin utiliser un insecte vecteur spécifique.

Tous les virus que nous avons étudiés étant du groupe « Mosaïque » et se transmettant facilement par voie mécanique, c'est ce mode de transmission que nous avons adopté (plutôt que la transmission par insecte vecteur), car il présente de nombreux avantages :

— tout d'abord, il est d'une extrême simplicité ; l'élevage d'insectes vecteurs au laboratoire et leur manipulation sont en effet des tâches très délicates ;

— ensuite, l'inoculation mécanique est beaucoup plus sûre, la date de contamination est connue avec beaucoup plus de précisions que lorsqu'elle est effectuée à l'aide d'insectes ; très souvent, en effet, ces derniers ont besoin d'une période d'adaptation lorsqu'on les change de plante-hôte ; ils ne se nourrissent pas pendant ce temps, ce qui rend la date d'inoculation imprécise ;

— enfin, lorsqu'on opère par voie mécanique, on peut déterminer avec précision la quantité d'inoculum et on peut la modifier suivant les exigences de l'expérience, surtout lorsqu'on travaille avec le virus de la mosaïque du Tabac ou les virus X et Y de la Pomme de terre, que l'on peut conserver sans difficultés, ce qui permet de recommencer les expériences dans des conditions identiques.

La technique d'inoculation mécanique des virus végétaux est décrite dans les ouvrages classiques de virologie (BAWDEN, 1950 (6), K. W. SMITH, 1951 (74)), aussi ne ferons-nous que décrire rapidement la méthode que nous avons utilisée. Nous avons toujours inoculé de jeunes plantes, par

exemple des Tabacs ayant 4 à 5 feuilles bien développées. Le plus souvent, c'est la feuille la plus basse que choisissent les virologues pour inoculer la maladie ; personnellement, nous préférons inoculer la première feuille adulte, comptée en partant du sommet de la plante ; nous entendons par « feuille adulte » la feuille qui vient juste de terminer sa croissance et qui est donc en pleine activité métabolique ; le virus s'y installe en effet d'une façon beaucoup plus rapide que dans la feuille la plus basse, qui présente souvent les premiers symptômes de sénilité. Nous saupoudrons la feuille choisie de carborandum et nous y déposons quelques gouttes de l'inoculum ; cet inoculum est réparti sur l'ensemble de la feuille par un frottement doux réalisé avec le doigt bien propre ou à l'aide d'un agitateur. Nous rinçons ensuite la feuille avec de l'eau distillée : cette opération a pour but d'éliminer les inhibiteurs d'installation du virus qui se forment par lésion des cellules ou par oxydation de l'inoculum lorsqu'il s'agit de jus bruts. Il est important d'éviter de faire des blessures graves à la feuille inoculée ; il faut, en effet, que le virus soit introduit dans une cellule en vie ; il ne peut se multiplier dans une cellule morte.

Dans la majeure partie des cas, l'inoculum était constitué de jus brut, obtenu par broyage de feuilles contaminées dans un tampon ou de l'eau distillée renfermant 5 p. 1000 de bisulfite de sodium (cette dernière précaution est recommandable pour les virus sensibles aux oxydations, tel le virus Y de la Pomme de terre). Pour certaines manipulations plus précises, le virus était purifié suivant la technique que nous allons décrire.

2° Purification des virus.

Les techniques de purification des virus végétaux sont également très classiques ; elles se divisent en deux grands groupes :

1° Purification par ultracentrifugation.

2° Purification par relargage.

Nous avons surtout utilisé le relargage et voici comment nous opérons pour la mosaïque du Tabac.

Les tissus sont broyés dans de l'eau au broyeur à hélices (type Turmix) ; on passe le jus à travers une étamine et on centrifuge afin d'éliminer les débris cellulaires. Au jus ainsi obtenu, on ajoute 300 g par litre de sulfate d'ammonium cristallisé. L'ensemble des protéines se sépare ainsi de la phase aqueuse et on les récolte par centrifugation. Le culot est remis en solution par un volume d'eau égal au 1/10^e du volume initial. On dialyse alors la solution obtenue contre de l'eau distillée à 4°C pendant 24 heures. La solution dialysée est ensuite traitée par un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium égal au 1/10^e du volume à traiter ou par 15 g/litre de phosphate disodique ; ce premier relargage fractionné a pour but d'éliminer une grande partie des protéines normales ;

on procède ensuite à un deuxième relargage par un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium égal au volume initial de la solution à traiter. Le précipité ainsi obtenu renferme en grande partie le virus que l'on récolte par centrifugation et que l'on remet en solution dans le minimum d'eau distillée. On dialyse de nouveau cette solution afin d'éliminer le sulfate d'ammonium excédentaire. On peut ensuite procéder à une précipitation au point isoélectrique.

3^o Dosage des virus.

Doser un virus n'est pas chose aisée. Diverses méthodes ont été proposées ; elles présentent toutes des avantages et des inconvénients. Nous allons étudier rapidement les principales méthodes proposées et décrire plus en détail celle que nous avons adoptée.

La première de ces méthodes est la méthode pondérale : on sépare le virus des autres constituants de la plante et on le pèse. Il faut, dans ce cas, des quantités importantes de matériel pour faire des mesures valables. D'autre part, la purification d'un virus de façon à n'avoir aucune impureté est un travail long et pénible ; il est surtout très difficile à effectuer d'une manière rigoureusement quantitative.

Une autre méthode utilise la formation de « lésions locales » ; elle est basée sur le fait que certaines plantes sont hypersensibles à un virus donné : le virus, inoculé dans les cellules de cette plante, s'y multiplie un certain temps, mais la réaction de la plante est tellement violente que les cellules infectées meurent rapidement et l'expansion du virus dans la plante cesse ; la feuille inoculée présente alors un certain nombre de taches nécrotiques, qui sont autant de points d'inoculation du virus. Cette méthode n'est évidemment valable que pour les virus qui présentent des hôtes à lésions locales ; c'est le cas du virus de la mosaïque du Tabac sur *Nicotiana glutinosa*. D'autre part, cette méthode donne une idée, non pas de la quantité totale de virus, mais uniquement du nombre de particules infectieuses ; on sait, en effet, qu'une plante atteinte d'une maladie à virus présente, à côté des particules infectieuses, d'autres particules qui, au microscope électronique, leur sont tout à fait semblables mais qui ne sont pas infectieuses ; on a parlé de pro-virus, de virus dégradé, etc. Nous n'interviendrons pas dans cette discussion mais nous pensons que dans une étude de déviation du métabolisme, ce matériel est aussi anormal que l'est le matériel infectieux.

C'est la raison pour laquelle nous avons adopté le dosage sérologique. Ce dernier présente en effet de nombreux avantages ; alors que le nombre de lésions locales n'est pas proportionnel à la concentration en virus, les différences observées dans une réaction antigène-anticorps sont proportionnelles à la concentration de l'antigène ou de l'anticorps ou

des deux à la fois. Un autre avantage de cette méthode, et qui n'est pas le moins négligeable, réside dans la stabilité des anti-sérums : ceux-ci sont, en effet, très faciles à conserver, lorsqu'on prend quelques précautions élémentaires ; grâce à cela, des dosages peuvent être faits à des époques éloignées, dans des conditions bien entendu standardisées, et rester comparables entre eux.

Pour doser sérologiquement le virus, nous avons utilisé la méthode d'évaluation du point-limite de dilution, méthode mise au point par P. LIMASSET et H. A. de MONTGREMIER (1947) (47) et dérivée du séro-diagnostic de JERMOLJEV et HRUSKA (1939) (41). Elle consiste à préparer une gamme de dilutions croissantes de la préparation virulente à étudier. Une goutte de chacune de ces dilutions est mélangée, sur une lame porte-objet, avec une goutte d'immunsérum. L'examen de la série de préparations est effectué au microscope à fond noir après une incubation de 15 minutes à 20°C. On détermine la plus forte dilution donnant encore un précipité visible, que l'on nomme « dilution-limite ».

Dans certains cas bien précis, en vue de nous assurer que nous mesurons bien une quantité de nucléoprotéines, nous avons employé la méthode de dosage des acides nucléiques d'OGUR (1950) (60), que nous résumerons au moment d'exposer les expériences qui ont nécessité son emploi.

4^o Dénaturation des virus par oxydation.

L'application de la méthode sérologique à la détection ou au dosage des virus phytopathogènes est parfois rendue très délicate par l'apparition de précipités spontanés dans les jus à éprouver. Ces précipités sont particulièrement fréquents lorsqu'on effectue le diagnostic des maladies à virus chez la Pomme de terre.

Notre travail a débuté par une étude de ce phénomène.

Pour détecter un virus chez une plante, on opère de la manière suivante : on broie les tissus : feuilles, tiges ou germes, avec une pince à extraction spéciale et on récolte le jus dans un tube à hémolyse. Ce jus est centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires et de clarifier la solution à éprouver. On prélève ensuite une goutte de jus que l'on dépose sur une lame porte-objet, on ajoute une goutte d'un antisérum spécifique, on mélange et on couvre d'une lamelle. Il est nécessaire, pour de nombreux virus, de laisser incuber la préparation pendant 15 à 20 minutes à la température du laboratoire avant de procéder à l'examen au microscope à fond noir. Pendant cette incubation, on observe souvent d'abondantes précipitations, tant dans la préparation témoin que dans le jus à éprouver. Ces précipités empêchent tout diagnostic puisqu'il n'est pas possible de distinguer, au microscope à fond noir, un précipité antigène-anticorps spécifique d'un autre précipité de quelque nature qu'il soit. Nous avons

d'autre part remarqué que les extraits dans lesquels se produisent ces précipitations sont ceux qui brunissent le plus au cours du broyage et après la centrifugation.

Or l'on sait que le brunissement des organes végétaux à la suite de lésions est dû à la mise en contact des oxydases et de leurs substrats avec l'oxygène atmosphérique et à la formation de produits d'oxydation des constituants phénoliques du suc cellulaire. De nombreuses réactions enzymatiques peuvent entrer en jeu, la plus simple étant l'oxydation directe des phénols par la polyphénoloxydase, mais d'autres peuvent également prendre place : c'est ainsi que l'eau oxygénée formée sous l'action des enzymes à flavo-protéines est utilisée par la peroxydase, toujours présente chez les plantes, pour oxyder un certain nombre de substrats.

Nous avons pensé que les floculations spontanées rencontrées au cours du diagnostic des maladies à virus étaient dues, en partie, à ces phénomènes d'oxydation et pour le démontrer nous avons cherché à les éliminer par l'emploi, soit de substances réductrices comme le bisulfite de sodium, soit d'inhibiteurs des enzymes à métaux lourds, comme le cyanure de potassium. Nous avons en effet constaté, sur plusieurs centaines de tests, que la préparation des jus à examiner en présence d'une solution de CNK à 2 p. 1 000 et de SO_3HNa à 1 p. 1 000 supprime à la fois le brunissement et les précipitations anormales, tout en conservant l'activité antigénique des extraits. Les laboratoires de sérologie chargés de détecter les virus X et Y dans les plants de Pomme de terre ont adopté cette technique.

Nous avons ensuite appliqué cette technique à la préparation de suspensions purifiées de virus Y destinées à la fabrication des anti-sérums. La méthode ordinaire, qui consiste à broyer les feuilles dans l'eau et, après centrifugation, à relarguer la solution par du sulfate d'ammonium, ne permet pas d'obtenir un sérum dont le titre en anticorps soit suffisamment élevé pour permettre un diagnostic aisé. Ici encore, nous avons supposé que les phénomènes d'oxydation jouaient un rôle. Pour le vérifier, nous avons préparé, à l'aide de tabacs inoculés par le virus Y, deux sérums, en effectuant les opérations suivantes :

- 1° Broyage des tissus au broyeur à hélice, type Turmix.
- 2° Centrifugation jusqu'à clarification.
- 3° Relargage par un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium.
- 4° Remise en suspension du culot obtenu par centrifugation, dans un volume de liquide physiologique (CINa 7 p. 1 000), égal au 1/15^e du volume initial.
- 5° Nouvelle clarification par centrifugation.

Au cours de ces opérations, nous avons introduit la variante sui-

vante : dans un cas, le broyage avait lieu en présence d'eau distillée ; dans l'autre, en présence d'une solution à 2 p. 1000 de cyanure et 1 p. 1000 de bisulfite de sodium.

La solution finale était ensuite inoculée à des lapins qui reçurent chacun 12 injections, réparties sur 3 semaines. Le taux en anticorps pour chacun de ces sérums fut comparé par la recherche de la limite de dilution en présence d'une solution de virus ; cette dernière était obtenue par simple broyage des tissus en présence de cyanure et bisulfite et clarification par centrifugation.

On constate, à l'examen des résultats (tableau I) que le sérum n° 1, préparé sans précautions spéciales contre les oxydations, présente une limite de dilution égale à 1/64 ; par contre, le sérum préparé à partir de virus isolé en présence de CNK et de bisulfite a une limite de dilution égale à 1/1024.

TABLEAU I

Dilutions-limites comparées de sérums préparés à l'abri des phénomènes d'oxydation (sérum n° 2) et sans précautions spéciales (sérum n° 1).

	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Sérum n° 1 sans KCN ni bisulfite	++ +	++ +	++	++	+	+	ε	?	o	o	o	o	o
Sérum n° 2 avec KCN et bisulfite	++ ++	++ ++	++ +	++ +	++ +	++	++	+	+	+	ε	?	o

Pour compléter cette expérience, nous avons évalué la quantité de virus Y que l'on peut extraire du Tabac :

— d'une part, en présence de cyanure de potassium et de bisulfite de sodium ;

— d'autre part, sans précautions spéciales contre les oxydations.

Le taux en antigène était déterminé en diluant cette fois l'antigène et en observant jusqu'à quelle dilution il réagissait avec un anti-sérum spécifique. Alors que les premiers jus extraits en présence de cyanure et de bisulfite supportaient une dilution de 1/64, les seconds ne donnaient plus de réaction antigène-anticorps pour une dilution supérieure au 1/16.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons tenté de reproduire, avec des solutions purifiées, les phénomènes de dénaturation qui ont lieu lorsque l'on broie les tissus à l'air sans précautions.

Pour cela, nous avons préparé une solution de polyphénol oxydase à partir de *Psalliotia campestris*, suivant la technique de KEILIN (1938) (42).

Nous avons, d'autre part, purifié des solutions de virus X et Y de la Pomme de terre et du virus de la mosaïque du Tabac et nous avons cherché à dénaturer ces solutions à l'aide de l'enzyme et d'un de ses substrats : le catéchol. Nous mélangeons :

1 ml de la solution de virus ;

1/2 ml de la préparation enzymatique ;

1/2 ml d'une solution de catéchol à 5 p. 1 000.

Après 15 minutes d'incubation à la température du laboratoire et une centrifugation afin de clarifier, dans le cas où il se formerait un précipité, la présence du virus était mise en évidence par la méthode sérologique.

Nous avons alors constaté qu'avec le virus X de la Pomme de terre de même qu'avec le virus de la mosaïque du Tabac, il n'y a pas disparition complète de la réaction antigène-anticorps, mais diminution du taux d'antigène dans les préparations traitées par la polyphénol oxydase en présence de catéchol. Par contre, avec le virus Y de la Pomme de terre et avec le virus de la mosaïque du Dahlia, il n'est plus possible de mettre le virus en évidence sérologiquement après action du système oxydant (tableau II).

TABLEAU II

Action des phénomènes d'oxydation sur des préparations purifiées de virus Y de la Pomme de terre.

Virus + Catéchol + enzyme	Virus + H ₂ O + enzyme	Virus + Cat. + H ₂ O	Virus + H ₂ O + H ₂ O	H ₂ O + Cat. + enzyme	H ₂ O/H ₂ O
+	++	+	++	++	+

Ceci peut expliquer les différences considérables trouvées par les différents auteurs quant au contenu en virus Y des feuilles de Tabac ; en effet, BAWDEN (1950) (6) ne trouve que 0,002 g de virus par litre de jus extrait des feuilles. MELCHER (53) en 1943, en trouve 0,03 g/l. et PFANKUCH (63), en 1943, 0,02-0,03 g/l.

II. — TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1° Chromatographie sur papier

Il n'est pas dans notre intention de développer ici cette technique qui a fait l'objet de tant d'ouvrages spécialisés (LEDERER (46) et BLOCK (12)). Nous verrons, au cours de chacune des expériences qui a nécessité son emploi, les solvants et les réactifs employés. Signalons simplement, dès maintenant, que nous avons employé la technique de chromatographie descendante et que la nature du papier utilisé était du papier Whatmann n° 1, 3 et 4.

2° Mesures d'activités enzymatiques.

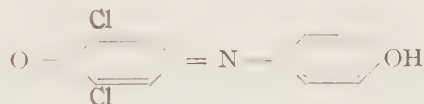
Celles-ci furent réalisées pour la plupart par la technique de WARBURG ; les détails de manipulation seront donnés au fur et à mesure de l'exposé des résultats.

V. — IMPORTANCE DES PHÉNOMÈNES D'OXYDATION CHEZ LES PLANTES VIROSÉES

I. — GÉNÉRALITÉS

Au cours du travail que nous avons réalisé pour perfectionner les techniques d'extraction et de dosage sérologique des virus, nous avons été amené à faire de nombreux broyages de tissus sains et malades de Dahlia, de Tabac et de Pomme de terre. Or, en comparant les jus extraits de deux plantes élevées dans les mêmes conditions de température, de lumière, de sol, etc. mais dont l'une est saine tandis que l'autre est malade, nous avons été frappé par la vitesse et l'intensité du brunissement des jus issus de plantes malades. Les jus de plantes saines brunissent également mais le phénomène est beaucoup plus lent et beaucoup moins intense que dans le cas de jus de plantes malades. Signalons cependant que la différence n'est vraiment nette que dans certaines conditions ; il faut, en effet, travailler avec des plantes jeunes, en pleine croissance et chez lesquelles le virus est en pleine multiplication ou juste en fin de multiplication, c'est-à-dire au moment de l'apparition des symptômes et autour de cette période. Il est difficile de préciser davantage ce moment : en effet, la multiplication du virus chez la plante est fonction de nombreux facteurs : température, lumière, etc., et même saison. Il faut saisir ce moment en observant journallement les plantes. Si l'on broie des plantes trop âgées, près de leur époque de floraison, il n'y a pratiquement plus de différence. Nous verrons, dans un chapitre ultérieur, comment expliquer, au moins en partie, ce phénomène.

Pour mettre en évidence l'intensité des oxydations chez les jus de plantes malades, nous avons choisi, parmi les différentes réactions que l'on peut utiliser, la recoloration d'un bleu d'indophénol réduit, le 2-6 dichlorophénolindophénol.



Cette substance facilement oxydable était autrefois utilisée pour la recherche de la cytochrome-oxydase ; on l'utilise encore actuellement pour titrer l'acide ascorbique oxydase. SMITH et STORZ (1949) (73) l'ont utilisée

pour mesurer colorimétriquement l'activité de la peroxydase et de la polyphénol oxydase chez les plantes. La technique est basée sur la recoloration du leuco-dérivé du bleu d'indophénol : 2-6 dichlorophénol-indophénol ou 2-6 dichlorophénol -3'-chlorindophénol par les produits d'oxydation formés après action de différents enzymes.

La technique décrite par SMITH et STOTZ a été reprise ; elle consiste à préparer une solution 0,0002 M de 2-6 dichlorophénol indophénol dans du tampon phosphate-citrate 0,1 M, pH 6,0. On filtre. On réduit ensuite cette préparation par une solution diluée de bisulfite de sodium ou par l'hydrogène en présence d'amianté platinée. Cette réduction est très délicate et il faut l'arrêter dès qu'elle est complète, c'est-à-dire dès que la solution est décolorée ; en effet, dans le premier cas, en présence de bisulfite, on risque de se trouver en milieu trop réducteur et dans le deuxième cas une action trop poussée de l'hydrogène en présence d'un catalyseur peut hydrogéner le noyau ; dans ces deux cas il est évident que l'on ne peut obtenir la recoloration du leuco-dérivé. On broie ensuite les tissus avec une pince à extraction spéciale et on prélève un peu de jus grâce à une pipette Pasteur ; on en dépose une goutte ou deux, suivant la plante étudiée, dans des tubes à hémolyse renfermant 1 ml de la solution d'indophénol réduit.

Si le jus provient d'une feuille malade, la solution se colore en bleu intense en quelques secondes, alors qu'avec un extrait d'une feuille saine, elle peut rester incolore plusieurs heures.

Ce que l'on met en évidence, c'est donc une différence dans la vitesse de recoloration du leuco-dérivé de l'indophénol, qui traduit d'une façon plus nette les différences de brunissement des jus de plantes saines et malades.

Avec le Tabac hébergeant la mosaïque du Tabac ou les virus X et Y de la Pomme de terre, on obtient une bonne réaction en opérant avec des plantes jeunes, un peu avant l'éclosion des symptômes ou au moment de leur apparition, en prélevant la première feuille adulte en partant du sommet.

A la suite de ces observations, nous avons cherché à standardiser cette réaction, de manière à pouvoir l'appliquer au diagnostic des maladies à virus de la Pomme de terre, ces dernières ayant une très grande importance économique. Le test à l'indophénol est applicable sur feuilles de Pommes de terre, mais il est beaucoup plus sûr et reproductible lorsqu'on travaille avec des germes ayant poussé dans des conditions bien déterminées ; il faut, en effet, choisir le moment où la synthèse du virus est très intense et c'est en faisant pousser les germes à l'obscurité jusqu'à ce qu'ils aient une longueur de 3 à 4 cm puis en les exposant ensuite à la lumière pendant 2 à 4 jours que l'on obtient le diagnostic le plus net.

On peut séparer les plantes saines de Dahlia des plantes malades,

à l'aide de ce test, mais nous n'avons pas encore précisé les conditions d'application de la méthode et ceci reste à faire; le Dahlia est en effet un matériel très hétérogène avec lequel il n'est pas facile de travailler.

Mais cette méthode est critiquable; en effet, l'indophénol réduit peut se réoxyder au contact de l'oxygène atmosphérique et il est indispensable d'avoir toujours un tube à hémolyse témoin renfermant 1 ml de la solution d'indophénol, à laquelle on n'ajoute rien.

Toutes ces observations et ces quelques expériences nous ont amené à supposer que les phénomènes d'oxydation subissent chez les plantes malades des perturbations importantes. Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant d'étudier l'activité de quelques enzymes responsables d'oxydation chez les plantes saines et chez les plantes malades, et plus particulièrement :

- la cytochrome-oxydase;
- la peroxydase;
- la poly-phénol-oxydase.

II. — ÉTUDE DE QUELQUES OXYDASES

Nous avons naturellement été amené à rechercher, par des mesures d'activité enzymatique, la nature des oxydases qui entraient en jeu dans la réaction que nous venons de décrire. Pour cela, nous avons travaillé avec :

- le Tabac, inoculé avec la mosaïque du Tabac et les virus X et Y de la Pomme de terre;
- la Pomme de terre, avec ses virus X et Y;
- le Dahlia hébergeant son virus de la mosaïque et le virus de la mosaïque du Concombre.

1^o Activité de la cytochrome-oxydase.

Nous n'avons fait que quelques mesures de l'activité de cet enzyme. Il est, en effet, capable de recolorer le bleu d'indophénol puisqu'on l'appelait autrefois « indophénol-oxydase ». Toutefois, son activité ne peut expliquer, à elle seule, le brunissement intense des jus que nous avons observé.

Pour étudier cet enzyme, nous avons employé la technique de McCLENDON (1952) (23).

50 g de feuilles sont broyées au mortier en présence de sable et de 50 ml de tampon phosphate disodique-monopotassique 0,1 M, pH = 7,1 et 0,4 M saccharose.

Le broyat, filtré à travers une étamine, subit une centrifugation sous une accélération de 1 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant, décanté,

est de nouveau centrifugé sous une accélération de 16 000 g pendant 30 minutes. On recueille alors le culot de centrifugation qui est lavé deux fois par 25 ml de la solution tampon et centrifugé chaque fois. Après ces deux lavages, nécessaires pour éliminer les enzymes solubles et en particulier la polyphénol-oxydase, le culot est repris par 5 ml de la solution tampon. Toutes ces opérations sont réalisées à une température inférieure à 4°C.

Les activités enzymatiques sont mesurées avec l'appareil de Warburg, en mettant en présence :

- 0,5 ml de la préparation enzymatique ;
 - 0,7 ml d'une solution de cytochrome C (fraîchement extrait de cœur de bœuf), titrant $1,4 \cdot 10^{-7}$ M/ml ;
 - 0,3 ml d'hydroquinone (7 mg/ml) ;
- Deux témoins permettent d'éviter toute erreur :
- d'une part, un témoin où l'hydroquinone est remplacée par du tampon ;

— d'autre part, un témoin où la préparation enzymatique a subi une ébullition de 5 minutes.

Les résultats, résumés dans le tableau III, sont traduits par le schéma n° 1.

TABLEAU III

Activité de la cytochrome-oxydase chez Nicotiana Tabacum.

Temps	Tabac sain	Tabac M. T.	Témoin sain Témoin M. T.
0	0	0	Dans ces fioles aucun échange gazeux n'a pu être mis en évidence.
5	4,20	10,23	
10	9,01	21,08	
15	13,28	31,20	
20	17,43	40,83	
25	20,42	48,67	
30	25,27	56,64	
35	28,86	63,59	
40	32,44	69,61	
45	35,41	75,00	
50	38,40	79,25	
55	40,83	82,80	
60	42,60	85,19	

Dans les fioles témoins, la solution enzymatique avait subi une ébullition de 5 minutes.

Poids sec :

Tabac sain	8,33 % de la matière fraîche
Tabac malade	9,41 % —

On s'aperçoit, à l'examen de ces résultats, que la quantité d'oxygène absorbée en 60 minutes peut atteindre 80 *ul* dans les fioles correspondant aux plantes malades et ne dépasse pas 40 *ul* dans les fioles renfermant des jus de plantes saines.

Les résultats sont calculés par rapport à 100 mg de matière sèche.

Signalons que les différences observées chez le Dahlia sont du même ordre de grandeur.

Cette augmentation de l'activité de la cytochrome-oxydase n'est pas étonnante en soi. On sait, en effet, depuis les travaux de WYND (1943) (95), que l'activité respiratoire des plantes malades est nettement supérieure à celle des plantes saines. Or, on admet généralement aujour-

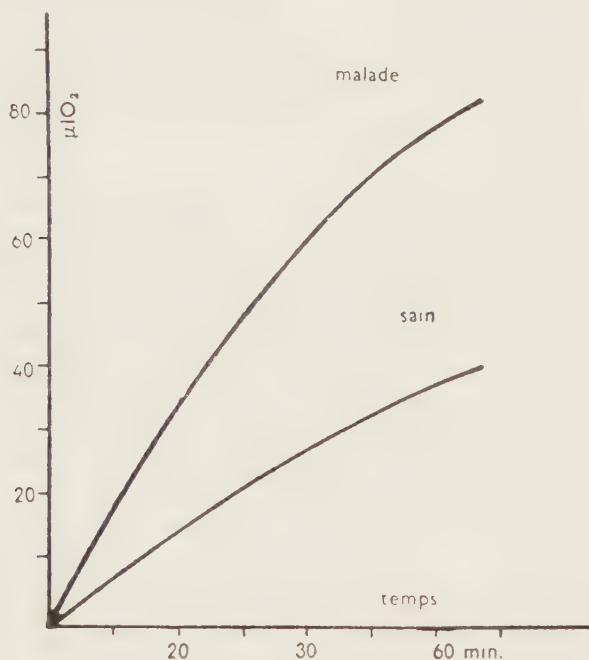


FIG. 1. — Activité de la cytochrome-oxydase chez le Tabac sain et chez le Tabac inoculé avec le virus de la Mosaïque du Tabac.

d'hui que la cytochrome-oxydase est un des enzymes terminaux de la chaîne respiratoire chez les végétaux. Il y a donc corrélation entre ces deux phénomènes.

2^o Activité de la peroxydase.

On sait que la peroxydase, en présence d'eau oxygénée, peut oxyder un grand nombre de substrats : amines aromatiques, phénols, etc. Cet enzyme est très répandu dans les organes végétaux. D'autre part, l'eau oxygénée se forme très souvent lorsqu'on broie à l'air des tissus végétaux, sous l'effet d'enzymes flavoprotéiques tels que la diamine oxydase (HARE, 1928 (36), PUGH et QUASTEL, 1937 (65)). Les mesures d'activité ont été faites suivant la technique classique de WILLSTÄTTER et STOLL

(1918) (88), modifiée par SUMNER et GJESSING (1943) (76). Voici en quoi elle consiste : dans un erlenmeyer de 100 ml, on place :

- 2 ml d'une solution de pyrogallol à 5 p. 100 fraîchement préparée ;
- 2 ml d'une solution tampon phosphate disodique monopotassique 0,5 M, pH = 6.
- 15 ml d'eau distillée.

Au temps 0 on ajoute 1 ml d'eau oxygénée à 1 p. 100. On laisse agir pendant 5 minutes en agitant et on arrête la réaction après ces 5 minutes en ajoutant 5 ml de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$. Le pyrogallol oxydé en purpurogalline est extrait par 50 ml d'éther. On mesure ensuite l'absorption de la solution étherée au photocolorimètre de Beckmann à 500 m μ . Une courbe étalon est établie avec de la purpurogalline de synthèse recristallisée dans le chloroforme et l'éther.

La majeure partie des expériences a été réalisée sur Tabac avec différents virus ; mosaïque du Tabac, virus X de la Pomme de terre et complexe de ces deux virus. Les plantes entières étaient utilisées et c'est une fraction aliquote, prélevée après broyage de la plante entière, qui servait à faire la mesure. L'étude a été faite en fonction du temps et les résultats, pour les plantes malades, exprimés en pourcentage de l'activité mesurée chez les plantes saines.

L'examen des résultats consignés ici sous forme de tableau IV et de schéma n° 2 montre que l'activité varie en fonction du temps d'une manière analogue pour les différents types de maladie.

TABLEAU IV

*Activité de la peroxydase en fonction du temps
chez Nicotiana Tabacum sain et malade.*

Plantes	Temps en jours											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
M. T.	100	100	124	110	99	108	81	182	134	117	110	114
M. T. + X	100	112	148	130	103	99	108	85	112	140	143	184
Sain	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

M. T. = Mosaïque du Tabac.

M. T. + X = Mosaïque du Tabac + Virus X de la Pomme de terre.

On observe, chez les plantes inoculées, un très léger maximum de 24 à 48 heures après l'inoculation, suivi d'une diminution d'activité vers le cinquième jour après l'inoculation, qui est telle que l'activité peroxydasique des jus de plantes malades devient inférieure à celle des jus de plantes saines ; puis un nouveau maximum a lieu au moment de l'éclo-

sion des symptômes. Mais il existe des différences considérables quant à l'importance de ce deuxième maximum, suivant les maladies : il est en effet peu marqué chez les plantes atteintes de mosaïque du Tabac (130 p. 100 de l'activité des plantes saines) ; un peu plus élevé chez les plantes hébergeant le virus X de la Pomme de terre (135 p. 100 par rapport aux plantes saines) et beaucoup plus élevé dans le cas du complexe où l'activité peroxydasique des plantes malades est le double de celle des plantes saines. Or, les symptômes dus à ces maladies sont très différents :

— la mosaïque du Tabac (M. T.) provoque une mosaïque sans nécrose ;

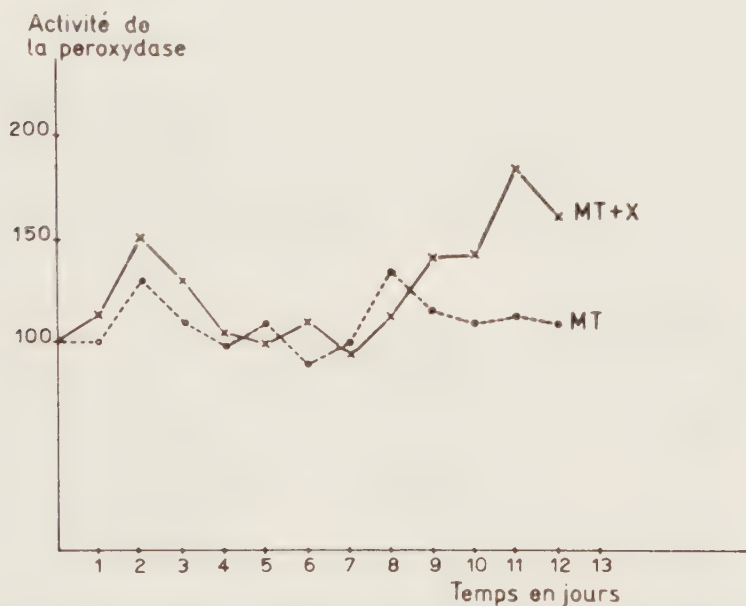


FIG. 2. — Activité de la peroxydase chez *Nicotiana Tabacum* infecté par le virus de la Mosaïque du Tabac (M. T.) et le complexe Mosaïque du Tabac + virus X de la Pomme de terre (M. T. + X) en pourcentage de l'activité de la peroxydase chez une plante saine.

— le virus X présente une très légère mosaïque avec de très fines nécroses ;

— la maladie complexe (M. T. + X) présente au moment de l'apparition des symptômes une mosaïque avec une très sévère nécrose de tous les organes.

S'il y a accroissement d'activité peroxydasique chez toutes les plantes malades au moment de l'apparition des symptômes, l'intensité de cet accroissement semble plus en rapport avec la nature des symptômes qu'avec celle du virus. Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse, en inoculant le virus de la mosaïque du Tabac au *Nicotiana glutinosa* qui réagit, comme on le sait, par lésions nécrotiques à l'inoculation par du virus, au lieu de présenter une simple mosaïque comme le *Nicotiana*

Tabacum. Le tableau V et le schéma n° 3 traduisent les résultats de cette expérience et montrent l'énorme activité peroxydasique au moment de l'apparition des nécroses : celle-ci est en effet plus du double de celle des plantes saines, chez les plantes inoculées.

TABLEAU V

*Activité de la peroxydase, en fonction du temps,
chez Nicotiana glutinosa sain et inoculé avec le virus
de la mosaïque du Tabac.*

Plantes	Temps en heures								
	24	36	48	60	72	84	96	120	144
M. T.	100	149	120	121	142	133	198	210	202
Sain	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Les résultats sont exprimés en fonction du poids sec.

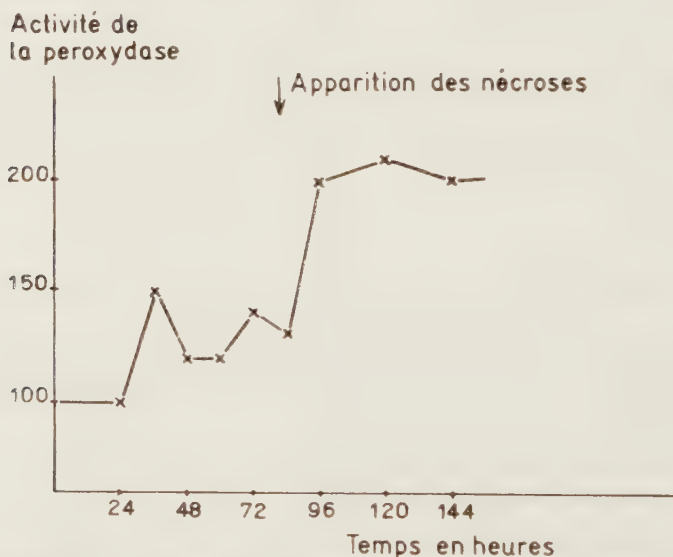


FIG. 3. — Activité de la peroxydase chez *Nicotiana glutinosa* inoculé avec le virus de la Mosaïque du Tabac, en pourcentage de l'activité du même enzyme mesurée chez une plante saine.

D'autres vérifications ont été également faites chez la Tomate ; en effet, cette plante, lorsqu'elle est inoculée avec le virus de la mosaïque du Tabac ou le virus X de la Pomme de terre, réagit respectivement à chacun de ces virus, par une mosaïque relativement légère et par un « vein-banding » (coloration vert foncé le long des nervures sur le fond vert clair de la feuille). Par contre, lorsque les deux virus sont inoculés ensemble,

on observe une sévère nécrose des tiges et des feuilles. Là encore, le maximum d'activité se rencontre chez la maladie complexe.

Toutes ces expériences ont été répétées 5 fois, ce qui nous permet de dire que seules les différences d'activité atteignant et dépassant 40 p. 100 de l'activité des témoins (plantes saines) sont significatives.

On peut donc émettre l'hypothèse après ces expériences, que l'intensité de l'activité peroxydasique chez les plantes atteintes de maladies à virus est plus ou moins proportionnelle à l'intensité des nécroses que ces maladies peuvent provoquer. Il faudrait cependant vérifier cette hypothèse avec d'autres types de virus et d'autres types de plantes.

3° Activité de la Polyphénol-oxydase.

On attribue généralement le brunissement des organes végétaux, lorsqu'ils sont broyés ou coupés, à l'action de la polyphénol-oxydase. Il était donc normal que nous étudions de manière beaucoup plus approfondie l'activité de cet enzyme chez les plantes malades.

La technique que nous avons utilisée est la suivante (MILLER et DAWSON, 1941 (56)) :

5 g de matériel (feuilles, tubercules ou germes) sont broyés dans 5 ml d'une solution tampon phosphate disodique-monopotassique 0,067 M, pH = 7 et le broyat est filtré à travers une étamine et centrifugé.

Les activités enzymatiques sont mesurées à l'appareil de Warburg. Chaque fiole renferme :

- 1 ml de la préparation enzymatique ;
- 1/2 ml de gélatine, à 1 mg/ml (**);
- 1 ml de pyrocatechol (solution à 4 mg/ml) dans le bras latéral de la fiole.

(**) — (La gélatine ayant pour but de protéger l'enzyme contre la dénaturation par les produits d'oxydation de la réaction. MILLER et DAWSON (56).

Deux séries de témoins permettent d'éviter toute erreur : une première série dans laquelle la préparation enzymatique a subi une ébullition de 5 minutes ; dans la deuxième série, le pyrocatechol est remplacé par de la solution tampon. La réaction est effectuée à 25°C et l'absorption d'oxygène est mesurée toutes les 2 minutes pendant 20 minutes.

Nous avons travaillé avec les plantes suivantes : Tabac, Pomme de terre et Dahlia. Les Tabacs sont inoculés par la technique que nous avons décrite antérieurement, par le virus de la mosaïque du Tabac, le virus X et le virus Y de la Pomme de terre. Les mesures sont faites sur les premières feuilles adultes en partant du sommet de la plante et à partir du moment où les symptômes apparaissent. A l'examen des résultats (tableau VI et fig. 4) on s'aperçoit que si, dans les conditions de l'expérience, les

plantes saines n'absorbent que 20 μ l d'oxygène en 20 minutes, les jus de plantes malades en absorbent entre 35 et 50 μ l pendant le même temps.

TABLEAU VI
Activité de la polyphénol-oxydase chez Nicotiana Tabacum.

Temps	Tabac sain	Tabac M. T	Tabac X	Tabac Y	Témoin
0.....	0	0	0	0	0
2.....	1,12	11,82	10,84	1,95	0
4.....	4,38	15,31	15,22	13,75	0
6.....	6,23	21,08	23,86	16,76	0
8.....	7,24	28,14	28,65	19,59	0
10.....	9,23	32,35	34,64	22,63	0
12.....	11,91	35,40	37,08	24,67	0
14.....	12,25	38,52	42,16	27,73	0
16.....	13,37	39,97	47,56	29,70	0
18.....	14,35	41,68	51,02	32,58	0
20.....	14,86	42,70	53,81	34,44	0

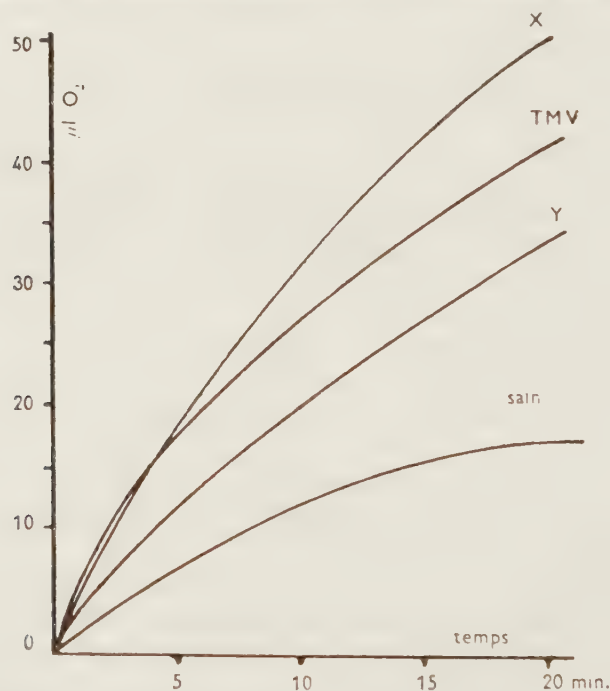


FIG. 4. — Activité de la polyphénol-oxydase chez le *Nicotiana Tabacum* sain et infecté par différents virus. M. T. = Mosaïque du Tabac. — X = virus X de la Pomme de terre. — Y = virus Y de la Pomme de terre.

Dans les fioles témoins, la préparation enzymatique avait subi une ébullition de 5 minutes.

Poids sec :

Tabac sain.....	8,17 %	de la matière fraîche
Tabac M. T.....	9,51 %	—
Tabac X.....	9,48 %	—
Tabac Y.....	11,17 %	—

Avec le *Dahlia*, l'expérience fut réalisée au moment de l'extériorisation maximum des symptômes, c'est-à-dire en juin; les plantes malades étaient atteintes du virus de la mosaïque du *Dahlia*. Le graphique qui traduit les résultats de cet essai (voir fig. 5 et tableau VII), montre

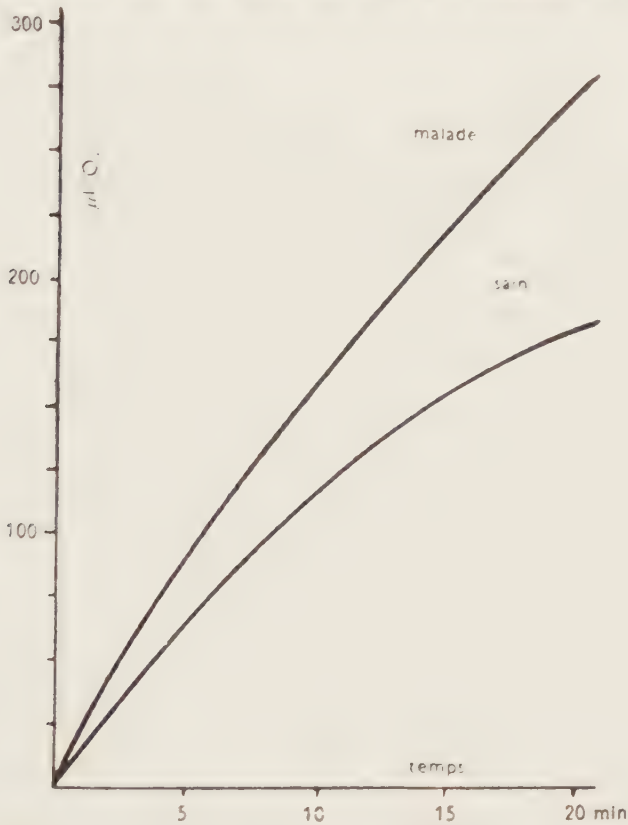


FIG. 5. — Activité de la polyphénol-oxydase chez *Dahlia variabilis* sain et infecté par le virus de la Mosaïque du *Dahlia*. Les résultats consignés dans les tableaux n° VI et VII et dans les figures n° 4 et 5 sont calculés par rapport à 100 mg de matière sèche.

TABLEAU VII

Activité de la polyphénol-oxydase chez *Dahlia variabilis*.

Temps	Plante saine	Plante malade	Témoin sain Témoin malade
0	0	0	Dans ces fioles aucun échange gazeux n'a pu être mis en évidence.
2	25,01	42,01	
4	54,82	84,12	
6	84,64	125,02	
8	121,03	159,04	
10	135,62	196,11	
12	152,04	223,96	
14	163,41	256,12	
16	169,52	277,23	
18	175,48	299,14	
20	181,14	316,16	

également une plus grande activité de la polyphénol-oxydase chez les plantes malades, puisque l'absorption d'oxygène, en 20 minutes, est de l'ordre de 300 μ l, alors qu'elle n'est que de 180 μ l chez les plantes saines.

Dans les fioles témoins, la préparation enzymatique avait subi une ébullition de 5 minutes.

Plante saine.....	9,17 % de la matière fraîche
Plante malade.....	10,14 % —

Pour la Pomme de terre, nous avons effectué quelques essais sur feuilles, de la même façon que pour le Tabac et le Dahlia, mais la plupart des expériences ont été réalisées sur des germes ayant poussé à l'obscurité jusqu'au moment où ils ont de 3 à 4 cm de longueur, puis exposés à la lumière pendant 48 heures ; le prélèvement des germes avait lieu après cette exposition à la lumière, les plantes étant atteintes, soit de virus X, soit de virus Y. Nous avons constaté également avec cette plante, lorsqu'elle héberge un virus, un accroissement notable de l'activité de la polyphénol-oxydase.

Ces premiers essais nous ont montré que l'accroissement d'activité de cet enzyme est variable suivant la plante et le virus, aussi avons-nous recherché la raison des ces différences. Pour cela, nous avons songé à étudier les variations d'activité enzymatique en fonction du temps, pendant les premiers jours qui suivent l'inoculation.

TABLEAU VIII

*Activité de la polyphénol-oxydase en fonction du temps
chez Nicotiana Tabacum sain et malade.*

Plante	Temps en heures											
	0	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264
M. T.	100	139	168	140	119	111	99	117	136	188	201	197
M. T. + X ...	100	148	210	179	142	120	122	125	178	227	258	264
Saine.....	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Nous avons donc inoculé à des Tabacs le virus de la mosaïque du Tabac (M. T.) et la maladie complexe : M. T. + X. Pour cette expérience particulière, qui ne dure que quelques jours et est donc toujours réalisée avec des plantes jeunes, donc relativement petites, la plante entière était prélevée, broyée dans le tampon et c'est une fraction aliquote, comme pour la peroxydase, qui était utilisée pour les mesures. Le tableau VIII et le schéma n° 6 traduisent les résultats obtenus, et on remarque qu'un premier maximum s'observe pendant une période s'étalant de 24 à 72 heures après l'inoculation ; l'activité de cet enzyme atteint, en effet, 108 p. 100 de celle des plantes saines chez les Tabacs

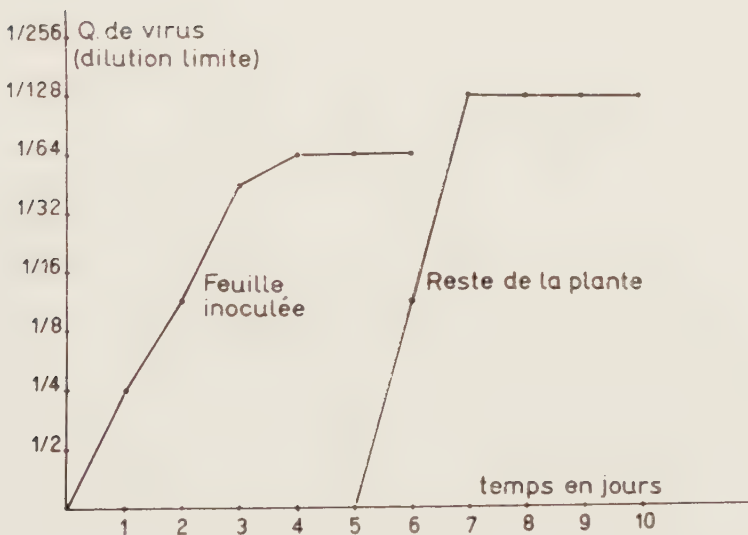
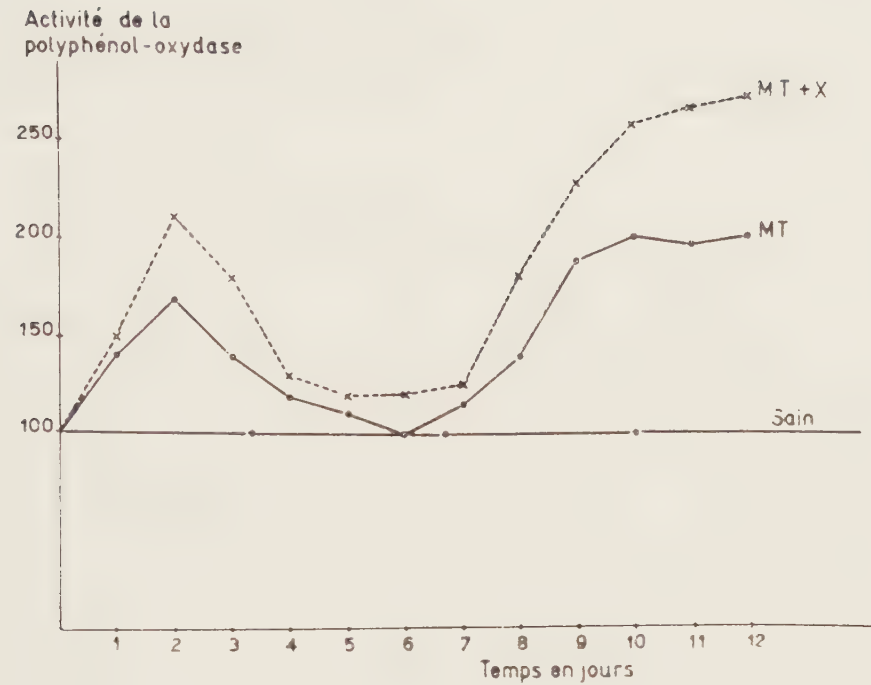


FIG. 6. — Étude de l'activité de la polyphénol-oxydase chez le Tabac : a) Le graphique du haut montre l'activité de la polyphénol-oxydase chez les plantes malades en pourcentage de l'activité chez les plantes saines. b) Le graphique du bas montre la synthèse du virus chez les plantes inoculées. M. T. = Mosaïque du Tabac. — M. T. + X = Mosaïque du Tabac et virus X de la Pomme de terre.

inoculés avec le seul virus de la mosaïque du Tabac (M. T.) et 210 p. 100 de l'activité des plantes saines chez les plantes hébergeant le complexe de virus (M. T. + X). Cette activité diminue vers les cinquième et sixième jours, où elle devient comparable à celle des plantes saines. Puis un

TABLEAU IX

*Absorption d'oxygène chez Nicotiana Tabacum sain
et inoculé avec différents virus.*

M. T. Mosaïque du Tabac.

X Virus X de la Pomme de terre.

Y Virus Y de la Pomme de terre.

Temps	Sain	M. T.	X	Y	Témoin sain	Témoin M. T.
0	0	0	0	0	Dans ces fiores aucun échange gazeux n'a pu être mis en évidence.	
2	1,62	2,58	1,90	2,12		
4	1,86	4,81	4,03	4,22		
6	1,90	7,18	6,02	6,28		
8	2,38	9,47	6,07	6,70		
10	2,61	10,84	8,11	8,32		
12	2,74	12,21	9,22	10,36		
14	2,77	13,08	9,84	11,30		
16	2,80	14,55	10,57	12,32		
18	2,81	15,27	11,17	13,42		
20	2,88	16,43	11,73	13,50		

Dans les fiores témoins, les extraits de plantes avaient subi une ébullition de 5 minutes.

TABLEAU X

Absorption d'oxygène chez Dahlia variabilis.

Temps	Plante saine	Plante malade	Témoin sain Témoin malade
0	0	0	Dans ces fioles aucun échange gazeux n'a pu être mis en évidence.
2	1,72	7,42	
4	3,81	14,84	
6	5,28	22,22	
8	6,14	28,58	
10	7,57	34,90	
12	8,21	30,64	
14	8,97	45,34	
16	9,42	49,58	
18	9,12	52,72	
20	10,01	55,76	

Dans les fiores témoins, les extraits de plantes avaient subi une ébullition de 5 minutes.

deuxième maximum apparaît, de huit à dix jours après l'inoculation ; l'activité des jus de plantes malades est alors de 197 et 264 p. 100 de l'activité des jus de plantes saines chez les Tabacs M. T. d'une part et M. T. + X d'autre part.



FIG. 7. — Absorption d'oxygène chez *Nicotiana Tabacum* sain et infecté par le virus de la Mosaïque du Tabac ou le virus Y de la Pomme de terre.

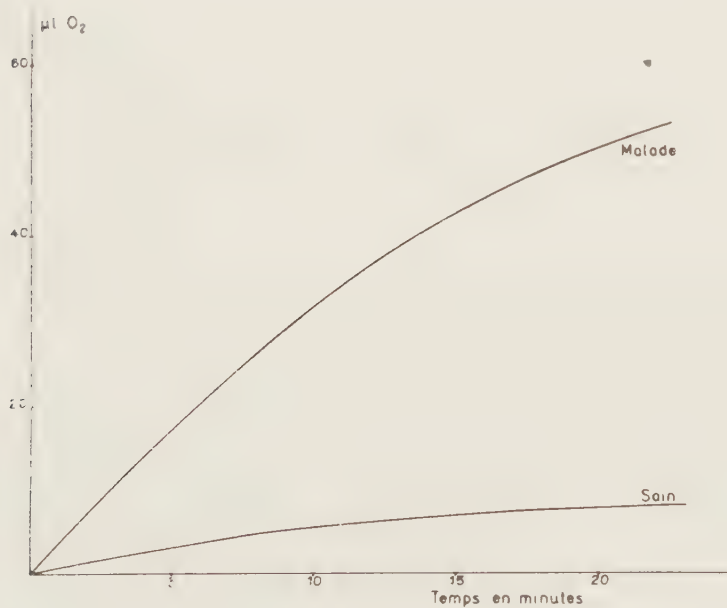


FIG. 8. — Absorption d'oxygène chez *Dahlia variabilis* sain et malade (Mosaïque du Dahlia). Les résultats consignés dans les tableaux n° IX et X, et dans les figures, n° 7 et 8 sont calculés par rapport à 100 mg de matière sèche.

Or, si l'on suit parallèlement l'évolution de la quantité de virus, on s'aperçoit que les 72 premières heures correspondent à une synthèse abondante de virus dans la feuille inoculée, tandis qu'à partir du sixième jour a lieu la généralisation de la maladie et la multiplication du virus dans tout le reste de la plante (MARTIN, 1958 (50)).

Il nous est impossible, pour le moment, d'interpréter ce phénomène, mais un autre fait a retenu notre attention, au cours de ces essais : en effet, dans certaines fioles témoins, le substrat était remplacé par du tampon ; il ne devait pas y avoir, théoriquement, d'absorption d'oxygène, à moins que les jus de plantes ne renferment suffisamment de substrats propres ; or nous avons eu l'occasion de constater, dans de nombreux cas, une nette absorption d'oxygène. Nous avons donc recommencé les expériences avec le Tabac et le Dahlia, en les modifiant légèrement ; pour bien mettre ce phénomène en évidence, les feuilles sont broyées rapidement à la température du laboratoire ; le broyat est passé à travers une étamine et le jus déposé aussitôt dans les fioles avec la gélatine ; les mesures sont effectuées à la température du laboratoire (le bain-marie n'étant pas réglé à 25°C comme dans les expériences précédentes). Cette façon d'opérer a permis de confirmer l'absorption propre d'oxygène par les jus de plantes malades, comme en témoignent les tableaux IX et X et les schémas n° 7 et n° 8 ; elle est, en effet, de 16 μ l pour le Tabac hébergeant le virus de la mosaïque du Tabac alors qu'elle ne dépasse pas 3 μ l avec le Tabac sain et atteint 55 μ l chez le Dahlia malade pour 10 μ l chez les plantes saines. Les chiffres donnés pour les plantes saines sont d'ailleurs des chiffres maxima ; le plus souvent, il n'est pas possible de mettre en évidence une absorption d'oxygène par les jus de plantes saines, tout au moins dans les conditions expérimentales que nous avons données.

VI. — MISE EN ÉVIDENCE ET IDENTIFICATION DES SUBSTRATS DE LA POLYPHÉNOL-OXYDASE

Après avoir mis en évidence, au cours de l'étude de l'activité de la polyphénol-oxydase, l'absorption anormale d'oxygène que nous venons de décrire, nous en avons recherché l'origine. Elle peut être due : — soit à une oxydation directe d'un substrat et dans ce cas, étant donnée la spécificité des enzymes, il ne pouvait s'agir que de composés phénoliques ; — soit à des oxydations couplées qui, elles, peuvent porter sur des composés très variés. Nous avons donc tout d'abord recherché s'il ne s'agissait pas de composés phénoliques.

I. — MISE EN ÉVIDENCE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

1^o Technique d'extraction.

Différents auteurs ont récemment étudié la composition en phénols de plantes par chromatographie sur papier. Citons, parmi les travaux les plus importants, ceux de ROBERTS et WOODS (1951) (67-68), qui ont étudié la composition en polyphénols des feuilles de Thé d'une part, et des feuilles de Tabac fermentées d'autre part. Dans ce dernier cas, les auteurs broient leurs tissus dans l'eau, font bouillir la solution ainsi obtenue pendant quelques minutes et centrifugent. C'est cette solution qu'ils chromatographient à 2 dimensions sur du papier Whatmann n° 1 :

- le 1^{er} solvant étant le phénol saturé d'eau ;
- le 2^e le Butanol-Acide acétique-Eau.

Ils révèlent leurs chromatogrammes par exposition aux vapeurs d'ammoniac et pulvérisation d'alun ferrique à 0,2 p. 100 ou de nitrite de sodium en présence de soude (10 p. 100).

Ils concluent de leurs essais que c'est l'acide chlorogénique et la rutine qui sont les phénols les plus abondants chez le Tabac, au moment de la récolte. Ils ne peuvent détecter ni l'acide cafféique libre, ni de tanins.

L'acide chlorogénique fut retrouvé, en 1955, par M. SHIROYA et S. HATTORI (72) dans les extraits de feuilles de *Dahlia variabilis* et dans les extraits de feuilles de Tabac (*Nicotiana Tabacum*, var. White Burley).

C'est la technique de ROBERTS et WOODS (65) que nous avons employée et modifiée comme suit : les feuilles de plantes à étudier, correspondant à un poids sec déterminé, sont broyées à froid dans l'alcool méthylique ou éthylique, afin d'éviter le plus possible les oxydations enzymatiques ; dans le cas où il se produit un brunissement du jus par oxydation au contact de l'air, on peut l'arrêter par adjonction de bisulfite de sodium à 1 p. 1 000. On filtre, on amène ensuite ces jus à sec par évaporation sous vide à 40°C et on reprend l'extrait sec par un volume connu d'alcool ou d'eau de manière à pouvoir comparer entre eux les différents extraits. Pour le Tabac et la Pomme de terre, 15 g de tissus frais correspondant à 1,5 g environ de poids sec, sont nécessaires pour cet essai. Pour le Dahlia, 5 g de feuilles, soit un poids sec d'environ 0,5 g sont suffisants. Les extraits secs sont alors repris par 2 ml d'eau distillée.

2^o Chromatographie des extraits.

Les solutions obtenues sont ensuite chromatographiées sur du papier Whatman n° 1 ou n° 4, en chromatographie descendante. Le principal travail a été de déterminer un mélange de solvants donnant de bonnes

séparations des phénols en chromatographie unidimensionnelle ; pour cela, les mélanges suivants ont été essayés :

Benzène-Acide Acétique-Eau 2/2/1 (BRAY, 1950) (14).

Butanol-Eau (Butanol saturé d'eau) (KELEMEN, 1950) (45).

Butanol-Ethanol-Eau 40/10/20.



FIG. 9. Chromatographie d'extraits de Pomme de terre dans le mélange classique Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50. A = plante malade (virus Y). B = plante saine. C = acide chlorogénique pur.



FIG. 10. Chromatographie des mêmes extraits que ceux de la figure n°9 sur papier tamponné à pH 7,5. A = plante saine. B = plante malade.

Benzène-Acide acétique 1 p. 100.

Butanol-Acide acétique-Eau 40/10,50 (BATE-SMITH, 1949) (5).

Aucun de ces mélanges ne donne de séparations convenables. Le meilleur semble être le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50, mais la séparation n'est pas encore parfaite avec ce solvant. Pour tenter d'améliorer les séparations, les feuilles de papier furent tamponnées, par trempage dans différents tampons. Les tampons étudiés par MC FARRER en 1951 (28) pour la séparation des acides aminés ont été utilisés

pour cet essai et finalement c'est le tampon phosphate 0,067 M, $\text{pH} = 7,5$, qui a donné les meilleurs résultats. La phase solvante est constituée de :

Butanol-Tampon-Acide acétique 150/50/5.

On obtient de cette manière, à partir d'extraits de Tabac et de Pomme de terre, de bonnes séparations des phénols par chromatographie à une seule dimension. Les figures 9 et 10 montrent des chromatographies d'extraits de Pomme de terre réalisées par cette technique et par la technique classique utilisant comme solvant le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40/10/50. On voit que, dans ce second solvant, il n'y a absolument pas de séparation des taches obtenues par révélation au nitrate d'argent, alors que l'emploi de tampon fait apparaître trois taches nettement distinctes.

3° Révélation des chromatogrammes.

Les chromatogrammes séchés sont d'abord examinés en lumière ultra-violette ; de nombreux phénols des plantes présentent, en effet, une fluorescence verte et il est alors facile de localiser les taches. Les chromatogrammes sont ensuite révélés avec différents réactifs des phénols.

Il existe peu de corps réagissant uniquement avec les phénols, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser plusieurs réactifs permettant de faire des recoupements. Les réactifs suivants ont été utilisés :

1° Les sels de diazonium.

Les sels de diazonium réagissent spécifiquement sur les phénols en milieu alcalin en donnant des produits colorés. Ils se décomposent rapidement à la température ordinaire et doivent être préparés immédiatement avant l'emploi. On utilise généralement, en raison de leur stabilité un peu plus grande, ceux que l'on obtient en diazotant l'acide sulfanilique ou la para nitraniline ; on les prépare de la manière suivante :

Pour l'acide sulfanilique (BLOCK, 1945 (12), HOSSFELD, 1951 (38)) on mélange à volume égal une solution d'acide sulfanilique (1 g d'acide sulfanilique, 8 ml d'acide chlorhydrique concentré, 100 ml d'eau) avec une solution de nitrite de sodium à 0,69 p. 100. On pulvérise le chromatogramme une première fois avec cette solution, puis une deuxième fois avec une solution de carbonate de sodium à 10 p. 100. Les taches représentant les composés phénoliques apparaissent en jaune orangé.

La p. nitraniline diazotée est préparée (BRAY, 1950) (14) en mélangeant 25 ml d'une solution de p. nitraniline à 0,3 p. 100 dans l'acide chlorhydrique à 80 p. 100 avec 1,5 ml d'une solution de nitrite de sodium à 5 p. 100. On pulvérise le chromatogramme avec cette solution, puis avec une solution de carbonate de sodium à 20 p. 100.

2° Le chlorure ferrique.

La plupart des phénols donnent avec le chlorure ferrique en milieu neutre ou légèrement acide des colorations rouges, violettes, vertes ou brunes dues à la formation de complexes avec l'ion Fe^{+++} ; ces réactions sont très souvent utilisées pour la recherche des phénols. Le réactif est employé en solution aqueuse à 0,1 p. 100. Il a le défaut d'être peu sensible.

3° Le nitrate d'argent ammoniacal, 0,1 N.

C'est un réactif beaucoup moins spécifique que les premiers, puisque toutes les substances aisément oxydables ont la propriété de le réduire ; il est cependant très utilisé à cause de sa grande sensibilité ; les composés phénoliques apparaissent en noir sur le fond blanc du papier après pulvérisation du réactif. Il est aisé de conserver ces chromatogrammes très spectaculaires en les fixant par trempage dans une solution d'hyposulfite. Tous les chromatogrammes photographiés dans ce mémoire ont été traités de cette façon.

4° Résultats.

1° Tabac.

Les chromatogrammes (fig. 11) obtenus de la façon que nous venons de décrire, à partir d'extraits de Tabac, montrent trois taches principales avec les différents réactifs utilisés. Il s'agit de phénols donnant une coloration verte avec le chlorure ferrique, jaune orangé avec l'acide sulfanilique diazoté ; ils présentent une fluorescence verdâtre par examen en lumière ultra-violette. Ils ont été numérotés 1, 2, 3, sur les chromatogrammes et les photographies montrent que c'est le phénol n° 3 qui est de beaucoup le plus abondant ; viennent ensuite, dans l'ordre, les phénols n° 2 et n° 1.

Ces taches sont beaucoup plus intenses chez les plantes atteintes de mosaïque que chez les plantes saines. Mais la différence entre plante saine et plante malade n'est pas toujours aussi nette ; elle est maximum lorsqu'on travaille avec des plantes jeunes, au printemps ou en été, c'est-à-dire en jours longs, et lorsque les plantes malades présentent leurs symptômes. Mais il n'y a plus de différence lorsque les plantes sont âgées et près de leur époque de floraison. De même, en hiver, sous faible intensité lumineuse, les plantes malades jeunes présentent certes des taches plus intenses que les plantes saines, mais la différence est beaucoup plus faible qu'en été.

2° Pomme de terre.

Les chromatographies réalisées à partir d'extraits de feuilles (fig. 12) montrent également un accroissement de la quantité de phénols chez les plantes malades, mais le nombre de taches est tel qu'il n'est guère possible



FIG. 11. — Accumulation de phénols chez le *Nicotiana glauca* :
A = plante saine. B = plante malade (le virus étant la Mosaïque du Tabac).

d'obtenir de bonnes séparations. Il est préférable d'étudier l'accumulation de ces substances dans les germes de Pomme de terre, organes dans lesquels la photosynthèse joue un rôle négligeable et où le nombre des composés phénoliques est beaucoup moins important ; ces germes sont obtenus de la même façon que ceux qui servent à étudier l'activité enzymatique, à savoir : croissance à l'obscurité jusqu'à obtention de germes

ayant de 3 à 4 cm de longueur, puis exposition de ces germes à la lumière pendant 72 h. On obtient, dans ces conditions, comme nous le verrons dans un chapitre ultérieur, une bonne multiplication du virus pendant



FIG. 12. — Accumulation de phénols chez la Pomme de terre (feuilles). A = plante saine. B = plante malade (virus Y).



Fig. 13. — Accumulation de phénols chez la Pomme de terre (germes). A = plante saine. B = plante malade (virus Y). C = Acide chlorogénique pur (extrait de café). E = Acide caféïque.

l'exposition à la lumière, alors que cette multiplication est faible à l'obscurité. On retrouve alors les trois mêmes taches que chez le Tabac quoique, chez les plantes saines, les deux taches supérieures, qui sont beaucoup moins intenses tant chez les plantes saines que chez les plantes malades, n'apparaissent pas toujours, aux concentrations auxquelles nous travaillons (fig. n° 13).

II. — IDENTIFICATION DES PHÉNOLS

1^o Tabac.

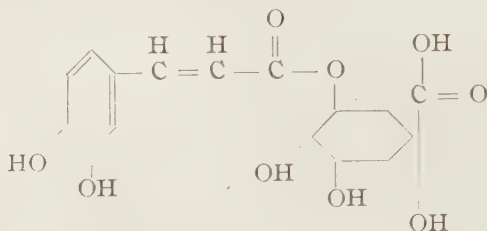
1^o Acide chlorogénique.

Après avoir mis en évidence l'accumulation de phénols chez les plantes malades, il était nécessaire d'isoler ces corps en vue de les identifier ; cette extraction a été extrêmement laborieuse en raison de leur concentration faible dans les organes végétaux étudiés. Pour cela, nous avons employé la technique suivante :

2 kg de feuilles sont broyées dans du méthanol et le jus obtenu est filtré après passage à travers une étamine afin d'éliminer les débris cellulaires. Le jus est amené à sec par distillation sous vide à 40°C, puis est repris dans 20 ml de méthanol. Cette solution est alors déposée en bande continue sur du papier Whatmann n° 3, tamponné à pH 7,5 et chromatographiée dans le mélange Butanol-Tampon pH 7,5-Acide acétique 150-50-5. Après développement et séchage, le chromatogramme est examiné sous lumière ultra-violette, ce qui permet de repérer l'emplacement des phénols grâce à leur fluorescence verte. Pour plus de sûreté on découpe, sur l'un des côtés du chromatogramme, une bande que l'on révèle au nitrate d'argent. Les bandes correspondant aux phénols sont alors découpées et éluées par de l'alcool éthylique. Après concentration, le liquide obtenu est à nouveau déposé de la même façon sur du papier Whatmann n° 3, non tamponné et chromatographié avec, comme solvant, le mélange Butanol-Ethanol-Eau 40-10-20. La bande correspondant au phénol est éluee comme précédemment et on procède à une troisième chromatographie avec, comme solvant, l'acide acétique à 2 p. 100. En employant, au départ, 5 à 6 feuilles de papier Whatmann n° 3, il est facile d'obtenir avec le phénol n° 3 de 15 à 20 mg d'un corps qui cristallise en fines aiguilles rassemblées en mâcles, ayant la forme d'oursins et fondant à 208°C. Ce corps, facilement soluble dans l'alcool et l'acétone, est pratiquement insoluble dans l'éther et le chloroforme ; ses solutions se colorent en vert en présence de FeCl_3 , ce qui semble indiquer que nous avons affaire à un ortho-diphénol. Il donne, en présence de nitrite de sodium et de soude, une coloration rose caractéristique de l'acide cafféique (HOEPFNER, 1932) (37). Or, on sait, depuis FREUDENBERG (1920) (32) que, chez les plantes, l'acide cafféique existe généralement en combinaison avec l'acide quinique pour former un depside : l'acide chlorogénique.

Or, le point de fusion de l'acide chlorogénique (208°C), correspond au corps que nous avons isolé.

D'autre part, l'acide chlorogénique a été signalé dans le Tabac en 1951, par ROBERTS et WOODS (67).



La synthèse de l'acide chlorogénique n'est pas réalisable pratiquement; par contre, les grains verts de café, où il forme un complexe avec la

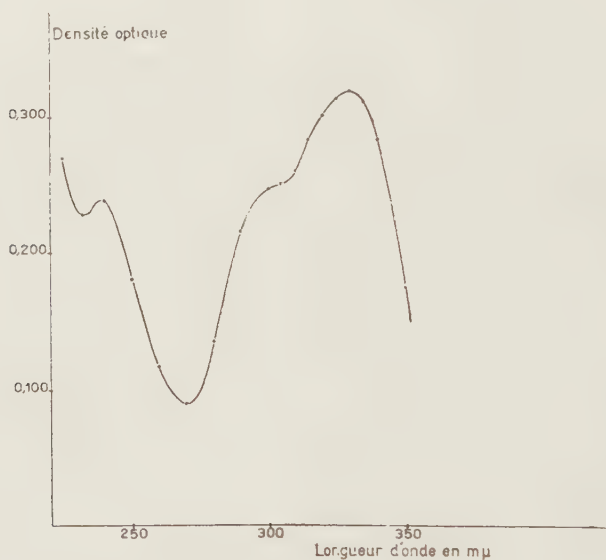


Fig. 14. — Sceptre d'absorption U. V. de l'Acide chlorogénique isolé de tabac.

cafféine, en renferment de grandes quantités, puisque la concentration dans ce matériel peut atteindre 3 p. 100. C'est donc à ce matériel que nous nous sommes adressé pour préparer un échantillon pur destiné à vérifier notre identification. L'acide chlorogénique du café fut isolé suivant la technique de GORTER (1909) (33) : les grains verts de café, broyés, sont extraits à l'eau froide en présence de toluène. L'extrait, concentré sous vide, est traité par l'alcool absolu de façon à obtenir une solution alcoolique à 50 p. 100. Le précipité qui se forme est filtré et redissous dans un minimum d'alcool à 50 p. 100, traité au charbon et cristallisé. Pour séparer la caféine du complexe, on redissout les cristaux dans un peu d'eau chaude et on extrait la caféine au chloroforme. La solution aqueuse est alors

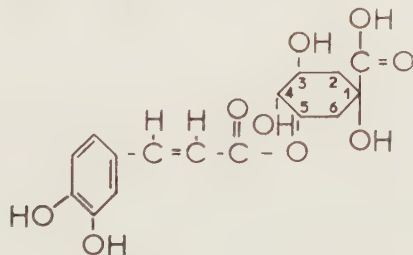
acidifiée avec de l'acide sulfurique ; l'acide chlorogénique pur précipite. On le recristallise dans l'eau. Le rendement est de l'ordre de 1 p. 100.

L'acide chlorogénique, ainsi isolé, se présente sous un aspect semblable au composé n° 3 du Tabac. Le point de fusion est identique : 208°C ; il ne varie pas lorsque l'on mélange les deux composés. Le R_f sur papier Whatmann n° 4 est identique : 0,52, dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50 ; les deux corps mélangés ne donnent qu'une tache. D'autre part, les spectres d'absorption déterminés au spectrophotomètre BECKMANN sont semblables (voir courbe, fig. 14). Il ne fait donc aucun doute que le phénol n° 3 est bien l'acide chlorogénique.

Ce corps est d'ailleurs très répandu dans le règne végétal puisque, en dehors du Café et du Tabac, on le retrouve chez le *Pinus laricio*, le *Larix europaea*, le *Papaver somniferum*, le *Digitalis purpurea*, le *Dahlia variabilis*. Il fut isolé pour la première fois par GORTER (33) sous forme de complexe cristallin, caféine-chlorogénate de potassium, duquel il sépara l'acide pur. La structure proposée par GORTER fut discutée en 1920 par FREUDENBERG (32), qui proposa alors une autre structure, qui fut définitivement reconnue, en 1932, par FISCHER et DANGSCHAT (30). Elle correspond à la formule que nous avons donnée plus haut.

2° Acide isochlorogénique.

Le corps numéroté « 2 » sur les chromatogrammes fut isolé de la même façon que l'acide chlorogénique, c'est-à-dire par chromatographie dans différents solvants sur papier Whatman épais n° 3. Mais les différents essais ayant pour but d'obtenir des cristaux ont échoué. Or, des travaux récents dus à BARNES et coll. (1950) (4) ont révélé la présence d'isomères de l'acide chlorogénique dans les extraits de café. Le plus important de ces isomères a été appelé acide isochlorogénique. C'est un isomère de position par rapport à l'acide chlorogénique ; ce dernier, en effet, est constitué d'acide caféique estérifié par l'hydroxyle en position 3 de l'acide quinique ; pour l'acide isochlorogénique, ce serait l'hydroxyle qui se trouve en position 5 qui interviendrait :



FISCHER avait d'ailleurs établi, comme preuve de la structure qu'il proposait, pour l'acide chlorogénique, qu'une lactone ne pouvait

se former puisque les hydroxyles 4 et 5 étaient en position trans par rapport au carboxyl. Il n'en est pas de même pour l'acide isochlorogénique où une lactonisation est possible ; elle a été démontrée par BARNES H. M. et coll. en 1950 (4). Ces auteurs attribuent d'ailleurs l'impossibilité d'ob-



FIG. 15. — Chromatographies comparées d'extraits de Tabac et de Café. A = Extraits de plantes malades (M. T.). B = Acide chlorogénique pur (extrait de café). C = Rutine pure. D = Extrait de Café (extraction méthylique).

tenir une forme cristalline de l'acide isochlorogénique au fait qu'on a toujours affaire à un mélange acide-lactone.

Dans le but de voir s'il s'agissait d'acide isochlorogénique, le phénol n° 2, en solution aqueuse, fut donc hydrolysé suivant la technique de BARNES par de la soude normale, sous atmosphère d'azote et à la température du laboratoire. On laisse l'hydrolyse se poursuivre toute une nuit, après quoi on acidifie avec une quantité équivalente d'acide

sulfurique. L'acide caféique est isolé du produit de saponification par extraction continue à l'éther. Le produit d'extraction à l'éther fut chromatographié sur du papier Whatman n° 1 avec, comme témoin, de l'acide caféique pur. Différents solvants furent employés : Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50 ; Butanol-Ethanol-Eau 40-10-20. L'acide caféique fut révélé par le nitrate d'argent. Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence d'acide caféique dans l'hydrolysate du phénol n° 2. Puis le liquide de saponification, après extraction à l'éther, est amené à sec et repris par l'acétone. Cette solution acétonique est chromatographiée avec, comme témoin, de l'acide quinique. Après développement, les chromatogrammes sont révélés par le réactif de CIFONELLI et SMITH (FEIGL, « Spot test », t. 2, p. 262) (29). La méthode consiste à pulvériser sur le chromatogramme :

1. — Une solution concentrée de métapériodate de sodium que l'on a étendue de 2 volumes d'eau. On attend 20 minutes et on pulvérise :

2. — Une solution composée de :

Nitroprussiate de sodium	50 mg
Piperazine	50 mg
H ₂ O	2 ml
Alcool éthylique.....	10 ml

On révèle 10 minutes à 100°C. L'acide quinique donne alors une tache orangée avec une marge verte. Cet acide quinique fut retrouvé dans l'hydrolysate du phénol n° 2.

Cependant, la chromatographie sur papier tamponné permettant d'obtenir des taches bien séparées, un extrait méthylé de grains verts de café fut chromatographié à côté d'un extrait de Tabac, afin d'apporter une preuve supplémentaire à notre identification. La photographie du chromatogramme (fig. 15) montre qu'il y a identité entre les trois phénols rencontrés chez le Tabac et ceux du Café. Il y a donc de grandes chances pour que le phénol n° 2 soit l'acide isochlorogénique de BARNES (4).

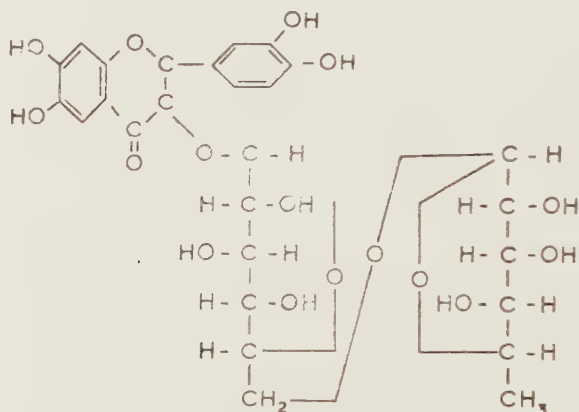
3° Composé n° 1.

Ce phénol fut isolé et traité de la même façon que l'acide isochlorogénique, ce qui permit de mettre en évidence l'acide caféique. Mais l'acide quinique n'a pu être retrouvé. Les trop faibles quantités de ce corps, chez le tabac, n'ont pas permis de pousser plus loin les investigations. Signalons cependant que ce corps semble identique à un phénol du café, comme le montre la figure 13. Il s'agit vraisemblablement d'un corps qui a la même constitution que les corps précédents avec une structure différente.

2° Pomme de terre.

Chez cette plante, le nombre des composés phénoliques dans les feuilles est tel qu'il n'est pas possible de les isoler aisément ; par contre, dans les germes, il est beaucoup plus réduit puisqu'ils ne sont que trois. Des chromatographies comparées d'extraits de germes de Pomme de terre, de feuilles de Tabac et de grains verts de Café ont permis de montrer l'identité de ces corps avec les acides chlorogénique et isochlorogénique et le composé n° 1, étudiés chez le Tabac.

D'autre part, au cours des extractions d'acide chlorogénique et isochlorogénique chez la Pomme de terre, nous avons séparé, purifié et cristallisé une autre substance phénolique : la rutine. C'est un rhamnoglucoside de la quercétine. Sa formule est la suivante :



On retrouve cette rutine chez le Tabac, le Dahlia et l'Hortensia ; mais il est important de signaler qu'on ne trouve ce corps que chez les plantes âgées, près de la floraison ou en pleine floraison. Il n'est pas possible de dire s'il y a accumulation de ce composé chez les plantes malades : en effet, chez une plante âgée, en fleurs, il n'existe plus de différence dans le contenu en phénols entre plantes saines et plantes malades.

3° Dahlia.

Quelques chromatographies réalisées avec des extraits de feuilles de plantes saines et de plantes malades ont permis de mettre en évidence l'accumulation d'acide chlorogénique chez les plantes hébergeant le virus de la mosaïque du Dahlia. D'autres phénols, dont la nature n'a pas été étudiée, s'accumulent également chez les plantes malades.

III. — ESSAI DE DOSAGE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE

1° Recherche d'une méthode de dosage.

Pour pouvoir comparer la teneur en phénols des plantes saines et des plantes malades, et étudier leurs variations, il fallait une méthode de dosage très sensible, permettant de déterminer d'une manière quantitative très précise les faibles quantités d'acide chlorogénique contenues dans les organes des plantes étudiées.

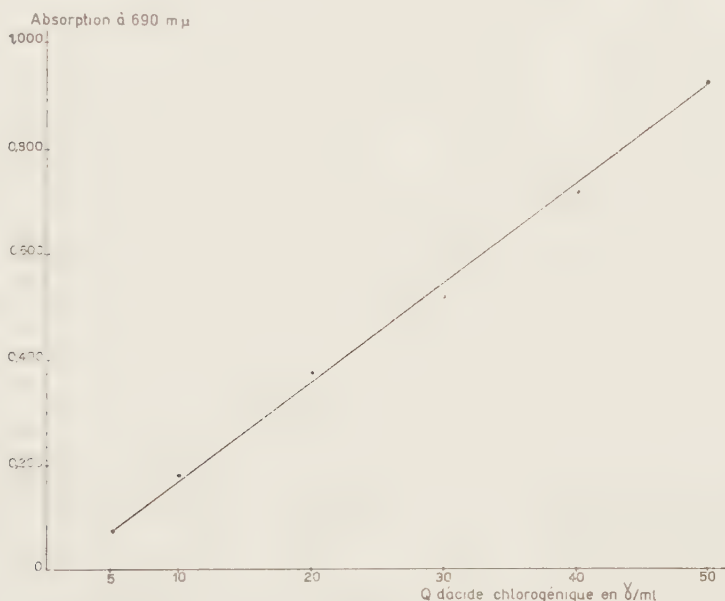


FIG. 16. — Courbe de dosage de l'acide chlorogénique par la méthode de PARK et JOHNSON (62).

Nous avons tout d'abord songé à utiliser la fluorescence et avons tenté de faire des essais qui, basés sur cette fluorescence et réalisés grâce au dispositif spécial de spectrophotométrie de Beckmann n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Cette méthode, qui donne de bons résultats avec des substances à très forte fluorescence, comme la scopolétine, ne permet pas le dosage de l'acide chlorogénique, dont la fluorescence est plusieurs milliers de fois plus faible.

Puis plusieurs réactions colorimétriques furent essayées :

— dosage colorimétrique du diazoïque de l'acide chlorogénique obtenu par action du sel de diazonium de l'acide sulfanilique en milieu alcalin ;

— dosage du produit coloré obtenu par action du nitrite de sodium en milieu alcalin (HOEPFNER, 1932) (37) ;

— évaluation de la coloration violette obtenue par action de l'acide chlorhydrique à l'ébullition ;

Mais aucune de ces méthodes n'est suffisamment sensible, puisque la limite inférieure de dosage est de l'ordre de 200 γ /ml.

Nous avons alors essayé d'utiliser les propriétés réductrices de ces phénols et nous nous sommes adressé à certaines microméthodes de dosage des sucres. C'est la méthode de PARK et JOHNSON (1949) (62), micromodification de la méthode de FOLIN et MALMROS (1929) (31) qui donne les meilleurs résultats. Voici en quoi elle consiste :

— on amène la solution à analyser à un volume connu de 1 ou 2 ml ;

— on y ajoute :

a) 1 ml d'un mélange carbonate-cyanure,

5,3 g CO_3Na_2 ,

0,65 g KCN,

1 litre d'eau distillée.

b) 1 ml d'une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ à 0,5 g/l ;

— on mélange et on chauffe au bain-marie bouillant 15 minutes ;

— on refroidit ensuite et on ajoute 5 ml d'une solution de sulfate ferrique constituée comme suit :

1 g $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$;

50 ml SO_4H_2 N ;

1 g de Duponol.

On détermine ensuite l'absorption au photocolorimètre à 690 m μ . Cette technique donne de très bons résultats, comme le montre la courbe étalon établie à partir d'acide chlorogénique pur (fig. 16) et est valable entre 5 et 100 γ /ml.

2° Résultats.

Nous avons tout d'abord effectué quelques dosages dans des feuilles de Tabac, var. Samson, sains et atteints de mosaïque. Ces premiers dosages nous ont montré que les teneurs en acide chlorogénique varient énormément suivant la saison, l'âge et l'état physiologique de la plante. Dans chaque expérience, les plantes malades renferment toujours plus d'acide chlorogénique que les plantes saines mais les valeurs absolues peuvent varier du simple au double, suivant les conditions extérieures.

Quelques-uns des résultats sont consignés dans le tableau suivant (XI).

Aussi, pour se mettre à l'abri de ces variations, d'autres dosages, plus nombreux, ont été réalisés sur germes de Pomme de terre ayant poussé dans des conditions déterminées et constantes. Voici quelles étaient ces conditions : on laisse pousser les germes à l'obscurité complète, à 20°C, jusqu'à ce qu'ils aient de 3 à 4 cm de longueur et, à partir de ce moment, on les éclaire grâce à 2 tubes fluorescents de 40 watts (2 000 lux)

(type Phytorel) par m² ; on ne change aucun autre facteur que la lumière et ce genre d'expérience peut être facilement renouvelé ; en effet, des tubercules de Pomme de terre, même en nombre important, occupent un

TABLEAU XI

*Teneur en acide chlorogénique du Nicotiana Tabacum
à différentes époques de l'année.*

	Dosage du 5-2-1957	Plante saine Plante malade	160 mg d'acide chlorogénique/kg poids frais 198 mg
Foete luminosité	Dosage du 17-4-57	Plante saine Plante malade	182 mg d'acide chlorogénique/kg poids frais 298 mg
Faible luminosité	Dosage du 15-5-57	Plante saine Plante malade	151 mg d'acide chlorogénique/kg poids frais 202 mg

faible volume ; il est donc facile de réaliser la chambre noire et d'y contrôler la température, l'humidité, la lumière, etc. La variété de Pomme de terre servant à cette étude était la Bintje. Les plantes malades étaient atteintes de virus Y.

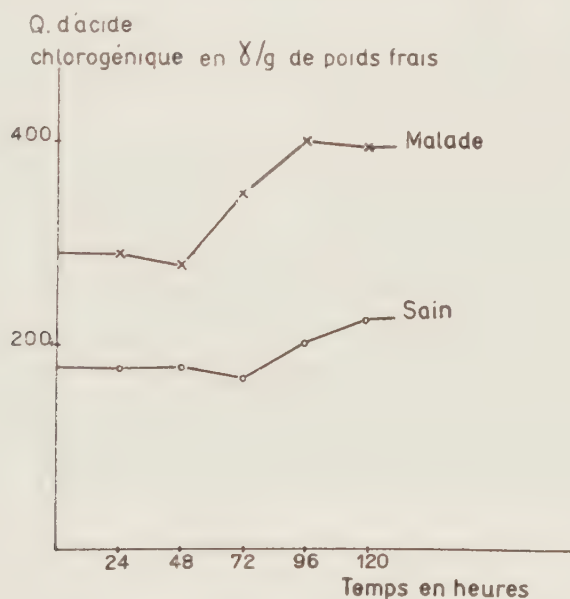


FIG. 17. — Évolution de la quantité d'Acide chlorogénique dans les germes de Pommes de terre saines et malades (virus Y).

A l'examen des résultats (tableau XII et fig. 17) on s'aperçoit que, même à l'obscurité, la quantité d'acide chlorogénique est plus élevée chez les plantes malades que chez les plantes saines, puisqu'elle est de

290 γ par g de poids frais chez les premières et de 178 γ par g de poids frais chez les secondes. Sous l'influence de la lumière, ces quantités augmentent aussi bien chez les plantes saines que chez les plantes malades,

TABLEAU XII

Évolution de la quantité d'acide chlorogénique en fonction du temps dans les germes de Pommes de terre saines et malades (virus Y).

Temps en heures	Q. d'acide chlorogénique en γ g de poids frais		Q. de virus dilution-limite	Poids sec en % du poids frais	
	Sain	Malade		Sain	Malade
0	178	290	1,32	8,58	9,80
24	180	290	1/64	8,92	10,14
48	180	280	1/128	9,55	10,78
72	170	370	1/128	8,90	10,12
96	200	405	1,128	8,93	10,17
120	210	395	1,128	9,01	20,45

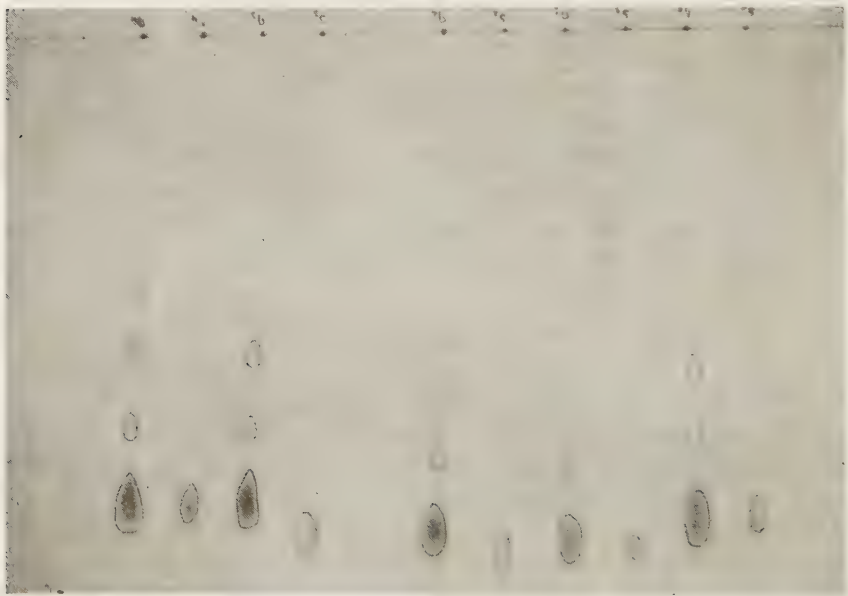


FIG. 18. — Accumulation de phénols dans les germes de Pommes de terre saines et malades (virus Y) en fonction du temps : De droite à gauche : S_0M_0 germes à l'obscurité ; S_1 et M_1 après 24 h. d'éclairement ; S_2 et M_2 après 48 h. d'éclairement ; S_3 et M_3 après 72 h. d'éclairement ; S_4 et M_4 après 96 h. d'éclairement ; S = sain ; M = malade.

mais cette augmentation est différente dans les deux cas ; en effet, alors que les chiffres passent de 178 à 210 γ par g de poids frais chez les plantes saines, ils varient de 290 à 405 γ par g de poids frais chez les plantes malades. L'évolution de la quantité d'acide chlorogénique est donc beaucoup plus importante chez les plantes malades, ce que l'examen des

chromatogrammes révélés au nitrate d'argent permettait déjà de prévoir (fig. 18).

Signalons, avant de passer à un autre chapitre, que l'accumulation de phénols semble apparaître après la synthèse du virus ; il nous est difficile de préciser davantage, car cette étude devrait être réalisée sur Tabac à partir de l'inoculation et en fonction du temps, dans des conditions de température et de lumière bien déterminées et constantes, ce qui n'était pas réalisable dans notre laboratoire.

VII. — MISE EN ÉVIDENCE ET IDENTIFICATION DE CORPS FLUORESCENTS CHEZ LES PLANTES ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS

Les phénols qui viennent d'être étudiés apparaissent sur les chromatographies d'extraits de Tabac, lorsqu'on les observe en lumière ultraviolette, sous forme de taches fluorescentes vert pâle. Or, en examinant ces chromatographies, il apparaît deux autres taches, de fluorescence beaucoup plus forte et de couleur bleu violet ; ces taches sont à peine visibles sur les chromatogrammes d'extraits de plantes saines ; elles sont beaucoup plus intenses sur ceux de plantes malades.

Afin d'identifier la plus importante de ces substances fluorescentes, nous avons cherché à en isoler par la technique qui nous a servi à isoler l'acide chlorogénique et ses dérivés. Mais ici une nouvelle difficulté est apparue : la concentration de ces corps dans la feuille est en effet beaucoup plus faible que celle des phénols qui viennent d'être étudiés. Voici la technique d'extraction qui fut utilisée :

5 kg de feuilles de Tabac malade sont broyées dans l'alcool méthylique ; le jus est filtré et concentré sous vide à 40°C. Le résidu sec est repris par de l'alcool éthylique ou méthylique additionné de 2 p. 100 d'ammoniaque, l'addition d'ammoniaque éliminant par oxydation les composés phénoliques ; on concentre à nouveau ce jus et on le dépose en bande continue sur du papier Whatmann n° 3, comme pour les phénols et on le sépare des autres impuretés par chromatographies successives avec comme solvant les mélanges :

Butanol-Acide acétique-Eau : 40-10-50.

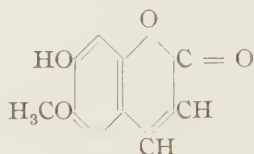
Butanol-Ethanol-Eau : 40-10-20.

Butanol 2 p. 100 d'ammoniaque.

La solution que l'on obtient en concentrant les derniers éluats possède une fluorescence très intense mais malgré cela il a été impossible de la faire cristalliser.

Mais nous avons vu que BEST, en 1944 (10) identifie la substance fluorescente qu'il avait mise en évidence chez la Tomate atteinte de Spot-

ted-Wilt et le *Nicotiana glutinosa* inoculé avec la mosaïque du Tabac, comme étant la scopolétine, c'est-à-dire la 6-méthoxy-7 hydroxy-1-2-benzopyrone :



Plus tard, en 1953, il affirme avoir retrouvé cette substance chez de nombreuses plantes hébergeant différents virus. D'autre part ANDREAE (1) retrouve la scopolétine chez les Pommes de terre atteintes du virus de l'enroulement.

Le travail de ces auteurs laissait à penser que l'on avait affaire, soit à de la scopolétine, soit à une coumarine substituée apparentée à la scopolétine. Les premières chromatographies ont permis d'établir qu'il ne s'agissait pas de scopolétine ; en effet cette dernière a un R_f de 0,85-0,86 dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50, alors que la substance isolée a un R_f de 0,52.

Puis ce corps fut comparé par chromatographie à différentes substances analogues :

- l'aesculetine du commerce,
- l'umbelliferone de synthèse,
- la daphnetine de *Daphne mezereum*,
- la fraxetine de *Fraxinus excelsior*,
- la bergenine de *Bergenia sp.*

Mais toutes ces substances ont des R_f différents.

Dans le but d'étudier sa nature, le corps fluorescent, isolé de Tabac malade, fut alors hydrolysé pendant 5 minutes à l'ébullition par de l'acide sulfurique 3 N ; l'acide fut ensuite précipité par la baryte et le produit d'hydrolyse, concentré sous vide, fut chromatographié sur papier Whatmann n° 1 dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50. Examiné sous lumière ultra-violette, le chromatogramme présente encore une tache fluorescente, mais de R_f beaucoup plus grand que le composé initial, puisqu'il est équivalent à celui de la scopolétine, soit 0,85-0,86. Ce produit d'hydrolyse fut alors chromatographié dans différents solvants avec la scopolétine pour témoin (voir tableau XIII).

Dans tous ces solvants, le corps fluorescent obtenu par hydrolyse avait le même R_f que la scopolétine.

On pouvait donc supposer que le produit d'hydrolyse était identique à la scopolétine et que le corps fluorescent présent dans les extraits de plantes malades était un glucoside de cette coumarine substituée. Il restait à identifier le ou les sucres résultant de l'hydrolyse sulfurique. Une chromatographie réalisée dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau a

permis de mettre en évidence un seul sucre, de R_f identique à celui du glucose. (Le chromatogramme était révélé grâce au réactif de NOVELLI (1950) (59), constitué de :

Alcool absolu	50 ml
N. Butanol.....	50 ml
HC 13,8 N.....	0,4 ml
Eau	0,2 ml
β Naphtylamine.....	0,100 g
Sulfate ferrique à 10 %	1 gtte

On chauffe le chromatogramme après l'avoir pulvérisé, à 150°C pendant 10 minutes. Avec ce réactif, les hexoses se révèlent en jaune brun et les pentoses en rose. Afin de vérifier d'une façon absolue l'identité du sucre lié à la scopolétine avec le glucose, nous en avons fait l'osazone, qui s'est révélée absolument identique à celle du glucose pur du commerce.

TABLEAU XIII

R_f de la scopolétine, de la scopoline du scopolia, et du corps fluorescent s'accumulant chez les plantes malades, dans différents solvants.

Mélange de solvants	Scopolétine	Scopoline	Corps fluorescent
Butanol — Acide acétique — Eau	0,85	0,52	0,52
40-10-50			
Butanol — Ammoniaque — Eau.....	0,26	0,26	0,26
150-1-50			
Isopropanol — Acétone — Eau.....	0,75	0,35	0,35
10-1-2			
Butanol — Ethanol — Eau	0,86	0,59	0,59
40-10-20			

On connaît actuellement deux glucosides de la scopolétine : la scopoline, corps qui fut isolé pour la première fois par MERZ, en 1932 (55) et la fabiatriine, dans laquelle le sucre est du β primeveroside (CHANDHURY et al. 1948) (21). On rencontre la scopoline dans la racine de diverses espèces du genre *Scopolia* ; pour s'assurer de l'identité du composé isolé de plantes malades avec la scopoline, nous avons isolé ce corps du *Scopolia carniolica* par chromatographie sur papier Whatmann n° 3, comme cela a été décrit plus haut. Le corps isolé de Tabac se comporte exactement de la même façon que la scopoline du *Scopolia*, par chromatographie dans les différents solvants cités plus haut, et les R_f correspondent à ceux donnés dans le tableau XIII.

Alors que la coumarine est un inhibiteur de croissance et a des effets antagonistes à ceux de l'auxine, on sait que la scopolétine possède, elle, des effets synergiques.

ANDREAE, en 1952 (2) constatant que la scopolétine avait, à certaines concentrations, une action synergique de celle de l'acide indol-

acétique (I. A. A.) sur l'élongation du coléoptile d'avoine, montre que cette scopolétine est oxydée par les préparations d'oxydase de l'I. A. A. et que sa présence inhibe la destruction de l'I. A. A. par cette oxydase. Il a été montré, d'autre part, que la croissance des racines de pois était stimulée par trempage préalable des graines dans une solution à $5,2 \cdot 10^{-6}$ M de scopolétine et que cette croissance était inhibée par l'emploi de solutions à $2,6 \cdot 10^{-4}$ M. Enfin, GOODWIN (1954) (34) montre que la scopolétine augmente l'inhibition de croissance des racines due à l'acide indol-acétique.

Il nous a paru intéressant d'étudier comparativement les effets

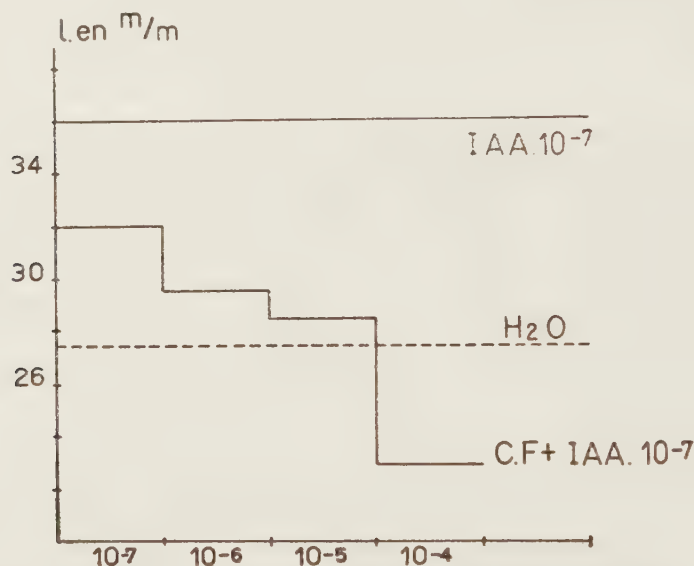


FIG. 19. — Action de la Scopoline sur la croissance du coléoptile d'Avoine. En abscisses : la concentration de scopoline ; — en ordonnées : l'élongation du coléoptile d'Avoine, en mm.

de la scopolétine et de son glucoside, la scopoline, isolée de plantes malades sur la croissance des coléoptiles d'avoine.

Nous avons adopté, pour ces essais, la méthode BONNER modifiée par NITSCH (1956) (58). Les concentrations de scopoline essayées variaient entre 10^{-3} et 10^{-9} en poids, soit entre $2,5 \cdot 10^{-6}$ M et $2,5 \cdot 10^{-11}$ M. Ces essais nous ont montré (fig. 19) que la scopoline est inhibitrice entre les concentrations 10^{-4} et 10^{-7} , soit $2,5 \cdot 10^{-6}$ M et $2,5 \cdot 10^{-9}$ M, mais elle ne présente d'action synergique de celle de l'I. A. A. à aucune concentration et elle semble beaucoup plus toxique que la scopolétine. On peut expliquer ce fait en admettant la théorie d'ANDREAE (2) ; en effet, la scopolétine ne possédant plus d'hydroxyle libre n'est plus oxydable comme l'est la scopolétine et ne peut plus, de ce fait, protéger l'I. A. A. de l'oxydation ; elle garde par contre toutes ses propriétés inhibitrices. Cette hypothèse

est d'ailleurs en partie confirmée par des travaux récents de RABIN et de KLEIN (1957) (69), qui montrent que l'acide chlorogénique protège également l'I. A. A. de l'oxydation ; or, l'acide chlorogénique possède deux hydroxyles à l'état libre sur la fraction acide cafféique et, de plus, ces auteurs ont également montré que l'inhibition compétitive était due à la partie acide cafféique de la molécule et non à la partie acide quinique.

VIII. — ÉTUDE SUR LES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES

1^o Introduction.

Au cours de nos recherches sur l'accumulation d'acide chlorogénique, en fonction du temps, dans les germes de Pomme de terre, nous avons relevé des anomalies de pigmentation chez les plantes atteintes de maladies à virus. Les germes de plantes saines présentent une pigmentation régulière et intense, de couleur violette ou rose suivant la variété ; par contre, les germes issus de plantes porteuses de virus Y présentent une juxtaposition de plages irrégulières, les unes étant pigmentées, les autres ne l'étant pas. Ces zones sont souvent allongées en bandes ou stries ; mais dans le cas d'attaques graves, lorsque la plante héberge deux virus par exemple (X + Y), il peut ne pas y avoir de pigmentation du tout. La photographie n^o 22 illustre bien ce phénomène et montre sa netteté.

L'altération de la pigmentation des fleurs chez les plantes atteintes de maladies à virus est un phénomène bien connu. BAWDEN (1950) (6) n'hésite pas à écrire que ce symptôme est une indication beaucoup plus spécifique de l'infection par une maladie à virus que les symptômes sur feuilles.

L'exemple le plus typique est certainement donné par la Tulipe. Chez cette plante, le virus 1 provoque une panachure irrégulière des pétales, qui se présente sous forme de larges stries blanches sur fond coloré. Ce phénomène, connu depuis très longtemps, fut appelé « Breaking » par les chercheurs de langue anglaise. Les producteurs hollandais de Tulipes n'ont d'ailleurs pas hésité à faire une variété nouvelle, appelée « Rembrandt » d'exemplaires malades de la variété « Princess Elizabeth ». Mais la Tulipe n'est pas le seul exemple de plante présentant une anomalie de pigmentation lorsqu'elle est malade. La Giroflée (*Cheiranthus cheiri*) atteinte d'un virus du chou (Cabbage blackring virus), la Violette, l'Anémone, la Renoncule, le Glaïeul, la Primevère, le Tabac, le Cattleya, etc. ont des fleurs panachées lorsqu'ils hébergent certains de leurs virus respectifs.

Par contre, il ne semble pas que l'on ait jamais signalé de pigmentation anthocyanique anormale sur des organes aussi différents de la fleur que le sont les germes de Pomme de terre.

2^o Étude comparée de la synthèse des anthocyanes chez les pommes de terre saines et malades.

Étant donné l'analogie de structure qui relie l'anthocyane aux phénols étudiés précédemment, il nous a paru intéressant d'étudier quantitativement la synthèse de ce composé en fonction de la quantité de virus chez les plantes malades.

Avant toute chose, il fallait déterminer la nature de l'anthocyane présente dans les germes de Pomme de terre de la variété Bintje.

1^o Nature du pigment.

Ce pigment fut isolé suivant la technique de ROBINSON et ROBINSON (1931) (70) ; pour cela, 1 kg de germes de Pomme de terre ayant poussé à la lumière et présentant donc un maximum de pigmentation est broyé dans l'acide chlorhydrique normal. Le pigment est alors extrait plusieurs fois par un mélange alcool amylique (2 parts) et acétophénone (1 part), contenant un peu d'acide picrique (1 g par litre de mélange). La couche organique séparée est filtrée, diluée avec de l'éther et extraite avec de l'acide chlorhydrique à 1 p. 100. La solution aqueuse est complètement libérée d'acide picrique par des extractions répétées à l'éther.

Puis les différents tests colorimétriques proposés par ROBINSON et ROBINSON (70) furent essayés avec cet extrait. Ces tests laissaient supposer que l'on avait affaire à la cyanidine. Pour s'en assurer, un peu de cyanidine fut extraite de *Centaurea cyanus* L. afin de comparer les réactions colorimétriques des deux corps : elles se révélèrent absolument identiques.

Enfin, pour confirmer l'identité du pigment anthocyanique des germes de Pomme de terre (var. Bintje) avec la cyanidine, le spectre d'absorption du pigment purifié fut établi grâce au spectrophotomètre de Beckmann ; nous le reproduisons ici (fig. 20) et l'on peut constater qu'il est absolument identique à celui donné par d'autres auteurs, tels SCHOU (cité par T. A. GEISSMAN, dans « Moderne Methoden der Pflanzenanalyse », de K. PAECH et M. V. TRACEY, vol. III).

2^o Dosage de la cyanidine

dans les germes de pommes de terre saines et malades.

Cette expérience fut réalisée sur des germes ayant poussé à l'obscurité totale, puis exposés à la lumière, comme cela a été décrit pour le dosage de l'acide chlorogénique. A partir du moment où les germes étaient

sortis de l'obscurité, un prélèvement était fait toutes les 12 ou 24 heures, dans le but :

- de doser l'anthocyane,
- d'évaluer la quantité de virus.

La quantité d'anthocyane était évaluée suivant la technique de K. V. THIMANN (1949) (80). Elle consiste tout simplement à broyer les organes dans de l'acide chlorhydrique normal et à centrifuger afin de clarifier la solution. Les valeurs données par cette simple extraction ont été comparées à celles obtenues après une séparation plus poussée par l'alcool isoamylique : ces valeurs sont absolument comparables et on ne

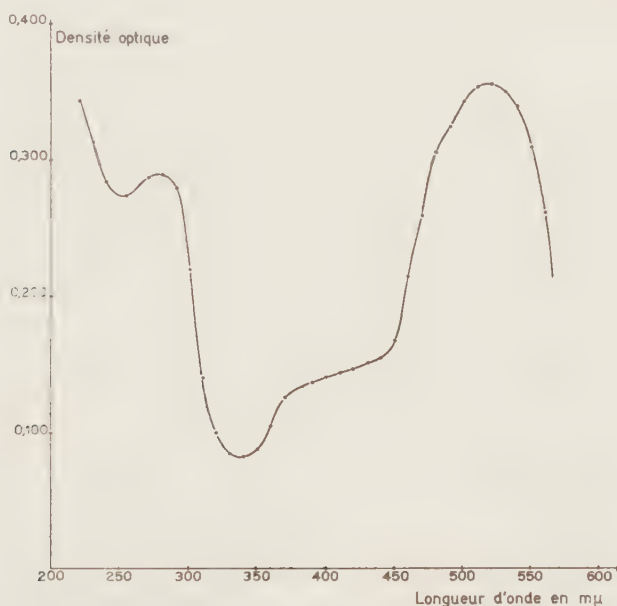


FIG. 20. — Spectre d'absorption de la Cyanidine extraite de germes de Pomme de terre (var. Bintje).

gagne rien à purifier la solution anthocyanique, comme l'avait déjà signalé THIMANN en 1949 (80). L'estimation de la quantité d'anthocyane se fait par lecture au photolorimètre de COLEMAN à 550 $m\mu$ et est exprimée en unités de pigment par gramme de poids frais de germe ; cette expression des résultats est d'ailleurs analogue à celle adoptée par THIMANN, puisque celui-ci exprime la quantité d'anthocyane en unités par 10 ml de solvant utilisé pour l'extraction d'un poids connu de matériel végétal.

Quant à la quantité de virus, elle fut évaluée sérologiquement par la limite de dilution, technique déjà décrite précédemment.

Les résultats d'une des expériences sont résumés dans le tableau XIV et traduits sous forme de schéma (fig. 21).

Les poids secs correspondant à cet essai sont ceux donnés dans le tableau XII ; les manipulations concernant le dosage des phénols et celui des anthocyanes ayant été faites sur le même matériel.

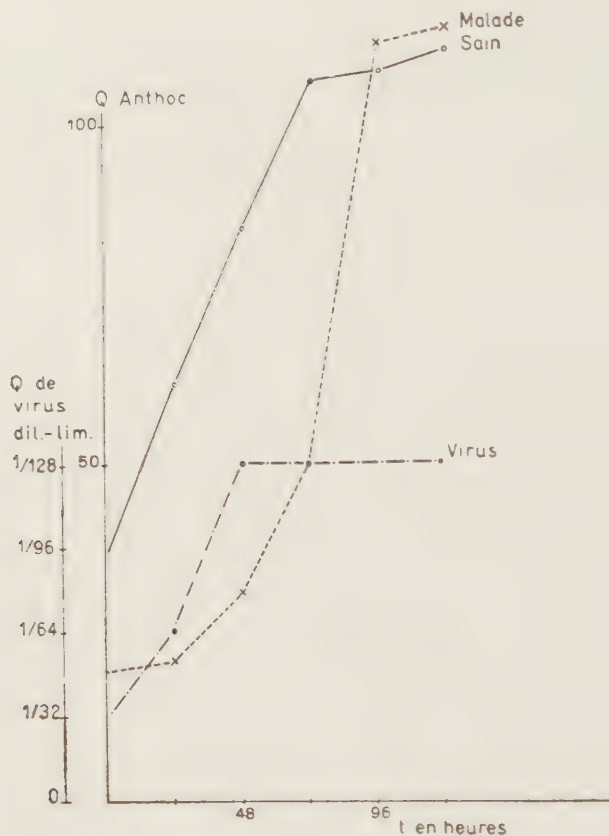


FIG. 21. — Evolution de la quantité d'anthocyanine et de virus en fonction du temps dans les germes de Pomme de terre saine et malade (virus Y).

TABLEAU XIV

Évolution de la quantité d'anthocyanine en fonction du temps chez la Pomme de terre saine et malade (germes).

Temps en heures	Quantité d'anthocyanine en unités par g de poids frais		Q. de virus dilution-limite
	sain	malade	
0.....	35	19	1/32
24.....	64	22	1/64
48.....	86	31	1/128
72.....	106	50	1/128
96.....	108	112	1/128
120.....	111	114	1/128

Il est maintenant bien démontré que les virus des plantes sont des nucléoprotéines. On connaît d'autre part la spécificité de la méthode sérologique. Cependant, afin de nous assurer, au cours des essais concernant les anthocyanes, que nous mesurons bien une quantité de nucléoprotéines, par la méthode sérologique, quelques dosages d'acides nucléiques furent réalisés par la méthode d'OGUR et ROSEN (1950) (60). Elle consiste à précipiter l'ensemble des nucléoprotéines par l'alcool éthylique et à laver ce précipité de nombreuses fois par des solutions d'alcool et d'éther, afin d'éliminer les substances pouvant interférer dans le dosage, puis à extraire les acides nucléiques par l'acide perchlorique à froid. On détermine ensuite l'absorption des solutions obtenues dans l'ultra-violet (au moyen d'un spectrophotomètre BECKMANN DU) ; le ribose est dosé colorimétriquement à l'orcinol.

Nous avons pu montrer ainsi que la quantité d'acide ribo-nucléique du virus Y, dans les germes de Pomme de terre var. Bintje, passent de 1, à 3,5 du temps 0 (obscurité) au temps de 92 h d'éclairement, ce qui confirme les résultats du dosage sérologique.

On s'aperçoit que si, chez les plantes saines, la quantité d'anthocyane croît régulièrement à partir du moment où les germes sont exposés à la lumière et passe de 35 au temps 0 à 111 après 120 heures d'éclairement, chez les plantes malades il y a d'abord un « plateau », pendant les premières 48 heures dans le cas présent, durant lesquelles la quantité de pigment ne s'accroît que faiblement, puisqu'elle passe de 19 à 31 ; puis, brusquement, une synthèse abondante a lieu, à une vitesse comparable à celle enregistrée chez les plantes saines ; à la fin de cette dernière période, la quantité de pigment est comparable chez les plantes saines et chez les plantes malades (111 chez les plantes saines et 114 chez les plantes malades).

Si nous examinons maintenant l'évolution de la quantité de virus dans les exemplaires malades pendant le même temps, nous nous apercevons que la quantité de virus qui était relativement faible au départ (dilution-limite 1/32) croît pendant les premières 48 heures pour arriver à un maximum (dilution-limite 1/128), maximum autour duquel les variations sont très faibles. Cette influence de la lumière sur la synthèse du virus n'est pas un phénomène nouveau, mais dans les conditions où nous l'avons étudiée, elle nous a permis de montrer son effet inhibiteur sur la formation de l'anthocyane.

Les résultats des dosages que nous avons effectués montrent en effet de manière très claire que la synthèse du pigment anthocyanique est inhibée pendant que le virus se développe (MARTIN, 1958) (52).

Ces essais laissent donc supposer qu'il existe un point commun entre la synthèse des nucléoprotéines (ou de leurs constituants, bases puriques et pyrimidiques) et la synthèse des pigments anthocyaniques. En effet,

d'une part une brusque synthèse de virus inhibe la production d'anthocyanes et, d'autre part, lorsque la synthèse de la nucléoprotéine est terminée, celle des pigments reprend.

Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec les conclusions que formulent K. V. THIMANN et coll. (1949 (80), 1951 (81), 1955 (82), 1955 (83), à la suite d'une série de travaux sur la synthèse des anthocyanes chez une lentille d'eau : *Spirodela oligorrhiza* Kurtz. En effet ces auteurs ont mis en évidence que :

1° La synthèse des anthocyanes chez cette plante est inhibée par des corps comme le thiouracil, la 2-6 diaminopurine, la 8-azaguanine, etc. qui sont des antipurines ou antipyrimidines.

2° Cette inhibition est détruite par des corps comme l'uracil, la purine et la guanine.

THIMANN et coll. concluent de ces essais que la synthèse des anthocyanes fait appel à une base purique ou pyrimidique, à un stade encore non déterminé de cette synthèse.

On sait, d'autre part, que la synthèse du virus est inhibée par les corps déjà cités : thiouracil, 2-6 diaminopurine, 8-azaguanine et que cette inhibition est détruite par leurs homologues naturels : uracil, adenine, guanine.

Ces deux synthèses, celle des nucléoprotéines-virus d'une part, et celle des anthocyanes d'autre part, présentent donc les particularités suivantes :

1. — Elles ont des inhibiteurs communs.
2. — S'il y a dans la cellule prédominance d'une des deux synthèses (cas des maladies à virus), l'autre est inhibée.

IX. — UTILISATION DE L'ANOMALIE DE PIGMENTATION POUR UN DIAGNOSTIC PRATIQUE DES MALADIES A VIRUS CHEZ LA POMME DE TERRE

Après avoir découvert des irrégularités de pigmentation des germes de Pomme de terre, nous avons cherché à utiliser ce caractère pour le diagnostic des plantes malades.

On sait, en effet, que la Pomme de terre est atteinte par trois virus du type mosaïque, les virus X, Y, et A. Or, si pour les deux premiers, on possède des anti-sérums spécifiques, il n'en est pas de même pour le virus A ; pour ce dernier, tous les essais visant à obtenir un anti-sérum utilisable pratiquement ont échoué. D'autre part, il serait, dans la pratique, intéressant d'avoir une méthode de diagnostic rapide permettant de tester un matériel important, ce que ne permet pas la méthode sérologique ; en effet, si cette dernière est précise et sûre, elle est relativement longue



Fig. 22 - Symptômes sur germes de pomme de terre
à gauche : germes sains - à droite : germes malades (virus Y)

lorsqu'elle est utilisée comme méthode de diagnostic. C'est la raison pour laquelle nous avons tenté d'appliquer le test à l'indophénol au diagnostic des maladies à virus de la Pomme de terre.

Cette mise au point du test sur germes de Pomme de terre nous a conduit à étudier les conditions d'humidité, de température et de lumière favorables à sa réalisation. En effet, nous avons indiqué que lorsque les germes poussent uniquement à la lumière, les extraits de plantes malades recolorent le leuco-dérivé d'indophénol plus vite et plus intensément que les extraits de plantes saines ; mais, dans certains cas, ces dernières donnent une recoloration qui n'est parfois pas négligeable ; si, par contre, les germes ont poussé uniquement à l'obscurité, les extraits de germes sains ne recolorent jamais l'indophénol, mais les extraits de plantes malades le recolorent beaucoup trop lentement. Il fallait donc déterminer les conditions pour lesquelles cette réaction était la plus nette.

Cette étude nous a permis de préciser les conditions suivantes pour la bonne réalisation du test : les tubercules étant au repos au moment où l'on effectue ce test, il faut tout d'abord rompre la dormance. Pour cela :

a) On les soumet à l'action d'un activateur de germination, mélange :

monochlorhydrate de glycol	7
dichloréthylène	3
tétrachlorure de carbone	1

b) Ils sont ensuite placés à l'obscurité complète, à une température comprise entre 18 et 22°C, dans une atmosphère à 90 p. 100 d'humidité.

c) Lorsque les germes ont de 3 à 4 cm de longueur, ils sont alors soumis à une lumière diffuse pendant 3 à 4 jours.

On obtient, dans ces conditions, un diagnostic colorimétrique parfaitement sûr (MARTIN et QUEMENER, 1956) (49.)

C'est également dans ces conditions qu'apparaissent sur les germes les symptômes très caractéristiques que nous avons décrits.

Néanmoins, le test à l'indophénol reste délicat dans son application pratique, du fait qu'il fait appel à une réaction enzymatique.

Par contre, l'anomalie de pigmentation est facilement utilisable comme moyen de diagnostic, les symptômes sur germes permettant de séparer avec une très grande précision les plantes atteintes de virus X, Y et A (fig. 22).

19 variétés, en dehors de la Bintje, ont déjà été étudiées dans le but de détecter, par cette méthode, les virus X et Y. Nous avons pu, de cette façon, montrer que la précision donnée par ce diagnostic est de l'ordre de 99 p. 100. Les quelques erreurs que l'on peut faire lors de l'examen après la première germination peuvent être corrigées par l'examen des germes après une deuxième germination ; on obtient d'ailleurs, dans ces conditions, des symptômes encore beaucoup plus nets qu'après la première germination.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Les observations faites au cours de l'extraction du virus de la mosaïque du Dahlia et au cours du diagnostic sérologique des virus de la Pomme de terre ont attiré notre attention sur l'importance des phénomènes d'oxydation lorsqu'on veut détecter ou isoler un virus.

Une première série d'expériences a permis de mettre en évidence l'importance de ces phénomènes d'oxydation dans la dénaturation de certains virus au cours de leur extraction. Nous avons pu montrer, de cette façon, que le virus Y de la Pomme de terre est complètement précipité de ses solutions après 15 minutes d'action du système Polyphénol-oxydase-catéchol.

Partant de ces faits, nous avons mis au point une technique qui, évitant ces oxydations, donne un diagnostic sérologique plus sûr et permet d'obtenir de meilleurs rendements au cours de l'extraction des virus.

Une étude plus détaillée a permis ensuite de montrer que ces phénomènes d'oxydation sont beaucoup plus importants chez les plantes malades que chez les plantes saines et se traduisent par un brunissement plus rapide et plus intense des jus de plantes malades. En utilisant la recoloration du leuco-dérivé du 2-6 dichlorophénol-indophénol, nous avons imaginé un nouveau test, permettant de séparer les plantes saines des plantes malades ; en effet, dans certaines conditions bien précises, les jus de plantes malades sont capables de réoxyder, donc de recolorer, ce leuco-dérivé, alors que les jus de plantes saines en sont incapables.

Nous avons alors étudié d'une façon plus approfondie l'activité de certaines oxydases chez les plantes malades ; cette étude nous a permis de montrer que les activités de la cytochrome-oxydase, de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase sont plus élevées chez les plantes atteintes de maladies à virus. Ces résultats confirment ceux obtenus par différents auteurs sur le Tabac inoculé avec le virus de la mosaïque du Tabac. Nous avons personnellement étendu ces résultats à d'autres virus (X et Y de la Pomme de terre sur Tabac) et à d'autres plantes : Tomate et Pomme de terre hébergeant leurs virus respectifs. L'étude plus détaillée sur la polyphénol-oxydase a permis de confirmer l'existence d'un premier maximum d'activité de 24 à 72 heures après l'inoculation, puis d'un deuxième maximum au moment de l'éclosion des symptômes. Cette étude, réalisée avec l'appareil de WARBURG, nous a permis de mettre en évidence une absorption anormalement élevée d'oxygène en l'absence de substrat, dans les fioles renfermant des jus de plantes malades.

Cette observation nous a amené à émettre l'hypothèse qu'il existait chez les plantes malades des substrats de cet enzyme, que l'on ne rencontrait pas chez les plantes saines, le brunissement intense du jus laissant supposer qu'il s'agissait de composés phénoliques. La chromatographie

sur papier tamponné nous a permis de mettre en évidence l'accumulation de différents composés phénoliques chez les plantes malades. Après avoir isolé et purifié de petites quantités de ces corps, nous avons pu les identifier comme étant les acides chlorogénique et isochlorogénique chez le Tabac et la Pomme de terre. Un autre phénol, renfermant de l'acide cafféique, a également été isolé, mais étant donné les faibles quantités de ce corps chez les plantes étudiées, nous n'avons pas pu pousser plus loin nos investigations à son sujet. Nous avons également montré, par chromatographie, l'accumulation d'acide chlorogénique chez le Dahlia atteint du virus de la mosaïque du Dahlia et du virus de la mosaïque du Concombre. Nous avons enfin, au cours de cette étude, isolé et caractérisé un autre phénol, la rutine, chez la Pomme de terre et le Tabac, lorsque ces plantes sont âgées et près de leur époque de floraison.

En nous basant sur le pouvoir réducteur des phénols et en utilisant la microméthode de PARK et JOHNSON (62) de dosage des sucres réducteurs, nous avons pu doser l'acide chlorogénique chez le Tabac et chez la Pomme de terre. Ces dosages montrent que la quantité d'acide chlorogénique chez les plantes malades peut atteindre le double de celle des plantes saines.

Cette étude nous a également permis de montrer que l'accumulation de phénols a lieu lorsque les symptômes sont nettement apparents, c'est-à-dire quand la synthèse du virus est pratiquement terminée.

Lorsque les plantes vieillissent et approchent de leur floraison, les différences s'estompent.

Ces observations permettent de suggérer qu'au moment où la plante fait la synthèse de la protéine-virus, il apparaît dans ses tissus des composés phénoliques analogues à ceux qui se forment lorsque le stimulus floral est déclenché, c'est-à-dire lorsque la plante synthétise une grande quantité de nucléoprotéines normales.

L'examen en lumière ultra-violette des nombreux chromatogrammes que nous avons été amené à faire au cours de l'étude des phénols nous a permis de mettre en évidence l'accumulation de composés fluorescents chez les plantes virosées (Tabac et Pomme de terre). Une étude détaillée du plus important de ces corps a montré qu'il ne s'agissait pas de scopolétine libre comme le pense BEST mais d'un glucoside de cette coumarine substituée, la scopoline, chez lequel le sucre rattaché à l'aglucone est le glucose.

Des mesures réalisées sur le coléoptile d'avoine ont montré que ce corps était inhibiteur de croissance et les résultats de cet essai permettent de confirmer, d'une façon indirecte, les résultats d'ANDREAE (1952) (2) et de RABIN et KLEIN (1957) (69) concernant l'inhibition compétitive de l'oxydation de l'indol-acétique par des corps comme la scopolétine et l'acide chlorogénique.

Etant donné ces faits, il est possible que l'accumulation de scopoline et de corps analogues joue un rôle dans le nanisme des plantes virosées.

Enfin, en voulant faire de la recoloration du leuco-dérivé du bleu d'indophénol un test permettant le diagnostic des maladies à virus chez la Pomme de terre, nous avons découvert que, dans des conditions bien précises, il existe des anomalies de pigmentation chez les germes issus de tubercules porteurs de virus. On connaissait déjà, depuis longtemps, l'influence des virus sur la pigmentation des fleurs, mais personne n'avait signalé cette action sur des organes aussi différents des fleurs que le sont les germes de Pomme de terre. Etant donné la généralité du phénomène et les possibilités qu'offrait le matériel Pomme de terre, il nous a semblé intéressant d'étudier, en fonction du temps et de la synthèse du virus, la production de pigments anthocyaniques (la cyanidine dans le matériel utilisé) chez les plantes saines et chez les plantes malades.

Cette étude nous a montré que la formation de l'anthocyane, dans le germe de Pomme de terre, est inhibée tant qu'il y a synthèse abondante de virus. Lorsque cette dernière est terminée, la synthèse du pigment reprend et il n'est plus possible alors de mettre en évidence une différence nette entre plante saine et plante malade.

Or, des travaux récents de THIMANN (83) et de ses collaborateurs ont montré que, chez *Spirodela oligorrhiza*, la synthèse de cyanidine est inhibée par des corps comme le thiouracil, la 2-6 diaminopurine, l'azaguanine, etc. D'autre part, cette inhibition est détruite par les homologues naturels de ces composés. THIMANN à la suite de ces essais, conclut que la synthèse des pigments anthocyaniques met en jeu une base purique ou plus vraisemblablement pyrimidique, à un stade encore non déterminé de cette synthèse. Enfin, d'après THIMANN, la synthèse des anthocyanes fait appel à un enzyme à Cu, qui est, sinon la polyphénol-oxydase, du moins un enzyme très voisin et des composés phénoliques interviennent vraisemblablement dans cette synthèse.

Or, on sait que la multiplication des virus est inhibée par les corps déjà cités et étudiés par THIMANN : thiouracil, 2-6 diaminopurine, 8-azaguanine et que cette inhibition est également détruite par les homologues naturels.

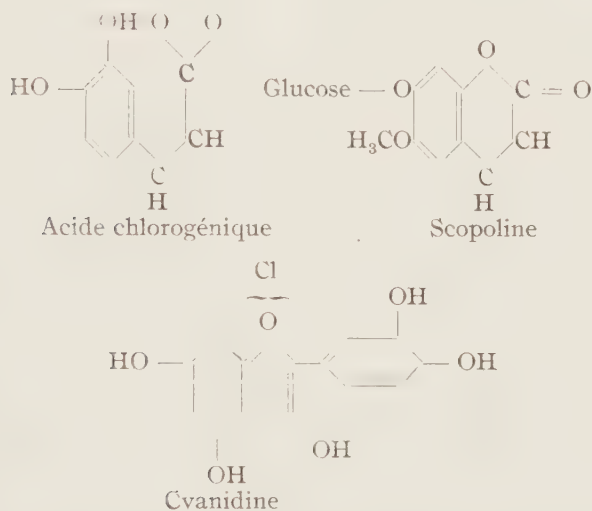
On peut donc imaginer que le virus, au cours de sa multiplication, interfère avec la synthèse des anthocyanes en détournant à son profit les bases puriques et pyrimidiques qui, normalement, interviennent dans la synthèse de ces pigments ; puis, lorsque le taux de virus atteint son maximum, ces bases sont de nouveau utilisables dans la chaîne de réactions qui mène aux anthocyanes.

Le fait que les deux phénomènes, synthèse de nucléoprotéines virus et d'anthocyanes, ont un point commun, semble confirmé par l'activité

accrue de la polyphénol-oxydase et par l'accumulation des composés phénoliques qui intervient dans les deux cas.

Enfin, un simple examen de la structure des différents corps que nous avons étudiés : phénols, corps fluorescents (scopoline) et anthocyane (cyanidine) montre leur grande analogie :

Ac. Quinique



On retrouve, dans tous ces corps, le noyau de l'acide cinnamique, cyclisé ou non, et diversement substitué.



Nos connaissances sur le mécanisme biologique de la synthèse de ce noyau d'une part, et des bases puriques et pyrimidiques d'autre part, ne sont malheureusement pas suffisamment avancées pour que nous puissions comprendre la façon dont interfèrent l'une sur l'autre ces différentes réactions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) ANDREAE (S. R.) et ANDREAE (W. A.). — The metabolism of scopoletin by healthy and virus potato tubers. *Can. J. Research*, **27**, 15-22, 1949.
- (2) ANDREAE (W. A.). — Effect of scopoletin on indolacetic metabolism. *Nature*, **170**, 58, 1952.
- (3) BACH (A.) et CHODAT (R.). — Zerlegung der sogenannten Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydasen. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, **36**, 606-609, 1903.

- (4) BARNES (H. M.), FELDMAN (J. R.) et WHITE (W. V.). — Isochlorogenic acid. Isolation from Coffee and structure studies. *Contr. from Centr. Labor. Genet. Foods Corpor.*, **72**, 4178-4182, 1950.
- (5) BATE-SMITH (E. C.) et WESTALL (R. G.). — Chromatographic behaviour and chemical structure. I. Some naturally occurring phenolic substances. *Bioch. Biophys. Acta.*, **4**, 427-440, 1950.
- (6) BAWDEN (F. C.). — Plant viruses and virus diseases, 327 p. Chronica Botanica Company, 1950.
- (7) BAWDEN (F. C.) et PIRIE (N. W.). — Physiology of virus diseases. *Ann. Rev. of Plant Physiology*, **3**, 171-188, 1952.
- (8) BERTRAND (G.). — Sur les rapports qui existent entre la composition chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase. *C. R. Acad. Sci.*, **122**, 1132-1134, 1896.
- (9) BEST (R. J.). — Studies on a fluorescent substance present in plants. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **14**, 199-213, 1936.
- (10) BEST (R. J.). — Studies on a fluorescent substance present in plants. 2. Isolation of the substance in a pure state and its identification as 6-methoxy-7-hydroxy-1 : 2 benzopyrone. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **23**, 251-255, 1944.
- (11) BEST (R. J.). — Virus. Host Interaction. *Aust. J. of Research*, **16**, 5-9, 1953.
- (12) BLOCK (R. J.), DURRUM (E. L.) et SWEIG (G.). — A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis. *Academic Press Inc.*, New-York, 484 p., 1955.
- (13) BONNER (J.). — Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the Avena coleoptile. *Amer. J. of Bot.*, **36**, 323-332, 1949.
- (14) BRAY (H. G.), THORPE (W. V.) et WHITE (K.). — The application of paper chromatography to metabolic studies of hydroxybenzoic acids and amides. *Biochem. J.*, **46**, 271-275, 1950.
- (15) BUNZEL (H. H.). — Biochemical study of the Curly-Top disease of sugar Beets. *Science*, **35**, 389, 1912.
- (16) BUNZEL (H. H.). — The measurement of the oxidase content of plant juices. *U. S. Departm. Agric. Bur. Plant. Ind.*, Bull. n° 238, 1912.
- (17) BUNZEL (H. H.). — Die Rolle der Oxydasen in der Blattrollkrankheit der Zuckerrübe. *Biochem. Zeitschrift*, **50**, 185-208, 1913.
- (18) BUNZEL (H. H.). — A biochemical study of the Curly-Top of sugar Beets. *U. S. Departm. Agric. Bur. Plant. Ind.*, Bull. n° 277, 1913.
- (19) BUNZEL (H. H.). — Oxidases reaction in healthy and in blighted Spinach. *J. Agr. Res.*, **15**, 377-380, 1914.
- (20) CALDWELL (J.). — The physiology of virus diseases in plants. VI. Some effects of mosaic on the metabolism of Tomato. *Ann. Appl. Biol.*, **21**, 206-224, 1934.
- (21) CHANDHURY (D. N.), HOLLAND (R. A.) et ROBERTSON (A.). — The synthesis of glucosides. Part XII : Fabiatriene. *J. Chem. Soc.*, 1671-1672, 1948.
- (22) CHAPMAN (G. H.). — Mosaic disease of Tobacco. *Mass. Agric. Exp. Sta. Bull.*, **175**, 73-117, 1917.
- (23) MCCLENDON (J. H.). — The intracellular localization of enzymes in Tobacco leaves. I. Identification of components of the homogenate. *Amer. J. of Bot.*, **39**, 275-282, 1952.
- (24) COMMONER (B.) et NEHARI (V.). — The effects of Tobacco mosaic virus synthesis on the free amino-acids and amide composition of the host. *J. of Gen. Physiology*, **36**, 791-805, 1953.
- (25) DOBY (G.). — Biochemische Untersuchungen über die Blattrollkrankheit der Kartoffel. I. Die Oxydasen der ruhenden Knollen. *Zeit. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.*, **21**, 10-17, 1911.
- (26) DOBY (G.). — Biochemische Untersuchungen über die Blattrollkrankheit der Kartoffel. II. Die Oxydasen der ruhenden und angetriebenen Knollen. *Zeit. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.*, **21**, 321-336, 1911.

- (27) DUNLAP (A. A.). — The total nitrogen and carbohydrates and the relative rates of respiration in virus infected plants. *Amer. J. of Bot.*, **17**, 348-357, 1930.
- (28) MC FARREN (E.). — Buffered filter paper chromatography of the amino acids. *Anal. Chem.*, **23**, 168-174, 1951.
- (29) FEIGL (F.). — Spot tests, vol. II, 436 p. Elsevier Publishing Company, 1954.
- (30) FISCHER (H. O.) et DANGSHAT (G.). — Konstitution der Chlorogensäure. *Ber.*, **65 B**, 1037-1040, 1932.
- (31) FOLIN (O.) et MALMROS (H.). — An improved form of Folin's micro-method for blood sugar determinations. *J. Biol. Chem.*, **83**, 115-127, 1929.
- (32) FREUDENBERG (K.). — Ueber Gerbstoffe. III. Chlorogensäure, der Gerbstoff - artige Bestandteil der Kaffeebohnen. *Ber.*, **53 A**, 232-234, 1920.
- (33) GORTER (K.). — Ueber die Verbreitung des Chlorogensäure in der Natur. *Arch. Pharmac.*, **247**, 184-188, 1909.
- (34) GOODWIN (R. H.) et POLLOCK (B. M.). — Studies on roots. I. Properties and distribution of fluorescent constituents in *Avena* roots. *Amer. J. of Bot.*, **41**, 516-520, 1954.
- (35) GUTHRIE (J. D.). — A method for the determination of peroxidase activity. *Contr. for the Boyce Thompson Inst.*, **53**, 242-244, 1931.
- (36) HARE (M. L. C.). — Tyramine oxidase. A new enzyme system in liver. *Biochem. J.*, **22**, 963-979, 1928.
- (37) HOEPFNER (W.). — Zwei neue Reaktionen für Kaffeesäure und Chlorogensäure. *Chem. Ztg.*, **56**, 991, 1932.
- (38) HOSSFELD (R. L.). — Paper partition chromatography of simple phenols. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 852-854, 1951.
- (39) HUNGER (F. W. T.). — Bemerkung zur Woods'schen Theorie über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Bull. de l'Inst. Bot. de Buitenzorg*, **17**, 1-9, 1903.
- (40) HUNGER (F. W. T.). — Untersuchungen und Betrachtungen über die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze. *Zeit. Pflanzenkrankh.*, **15**, 257-311, 1905.
- (41) JERMOLJEV et HRUSKA. — Serologische Methode zur Feststellung der Kartoffelvirus Krankheiten. *Der Kartoffelbau*, **11**, 125, 1939.
- (42) KEILIN (D.) et MANN (T.). — Polyphenol-oxidase. Purification, nature and properties. *Proceed. of Roy. Soc., B* **125**, 187-204, 1938.
- (43) KUBOWITZ (F.). — Ueber die Chemische Zusammensetzung der Kartoffel-oxidase. *Biochem. Zeitsch.*, **292**, 221-229, 1937.
- (44) KUBOWITZ (F.). — Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochem. Zeitsch.*, **299**, 32-57, 1938.
- (45) KELEMEN (E.), TANOS (B.), et HALMAGYI (D.). — Separation of p. amino-benzoic acid derivatives by paper chromatography. *Biochem. J.*, **47**, 138-139, 1950.
- (46) LEDERER (E.) et LEDERER (M.). — Chromatography. Elsevier Publishing Company, 460 p., 1953.
- (47) LIMASSET (P.) et AUGIER de MONTGREMIER (H.). — Sur une méthode de dosage des virus des plantes. *C. R. Acad. Sci.*, **225**, 1176-1177, 1947.
- (48) MARKHAM (R.). — Les maladies à virus des végétaux et leur identification. *Endeavour*, **16**, 99-106, 1957.
- (49) MARTIN (C.) et QUEMENER (J.). — Sur un test colorimétrique et quelques symptômes permettant la détection des maladies à virus chez la Pomme de terre. *C. R. Acad. Agric.*, **42**, 426-431, 1956.
- (50) MARTIN (C.). — Étude comparée de l'activité de la polyphénol oxydase chez le tabac sain et inoculé par une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 2026-2029, 1958.
- (51) MARTIN (C.) et MOREL (G.). — Accumulation de composés phénoliques chez les plantes atteintes de maladies à virus. *C. R. Acad. Sci.* **246**, 2283-2286, 1958.

- (52) MARTIN (C.). — Altération de la pigmentation anthocyanique chez les germes de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *C. R. Acad. Sci.* **246**, 2790-2792, 1958.
- (53) MELCHERS (G.). — Die Darstellung des Nucleoproteids des Kartoffel Y Virus. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **61**, 89-90, 1943.
- (54) MENEGHINI (M.) et DELWICKE (C. C.). — The multiplication of Tobacco mosaic virus in the host Tobacco plant. *J. Biol. Chem.*, **189**, 177-186, 1951.
- (55) MERZ (K. W.). — Ueber das Cichoriin und die Konstitution des Aesculins und des Scopolins. *Arch. Pharm. u. Ber. Deutsch. Pharm. Ges.*, **270**, 476-495, 1932.
- (56) MILLER (W. H.) et DAWSON (C. R.). — Factors influencing the catecholase activity and inactivation of tyrosinase. The effect of gelatin and of catechol concentration. *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 3368-3374, 1941.
- (57) NEGER (F. W.). — Die Blattrollkrankheit der Kartoffel. Ein Beitrag zur Aetiologie der Krankheit und der Physiologie der Kartoffelstaude überhaupt. *Zeit. Pflanzenkrankh.*, **29**, 27-48, 1919.
- (58) NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — Studies on the growth of coleoptile and first internode section. A new, sensitive, straight growth test for auxins. *Plant Physiology*, **31**, 94-111, 1956.
- (59) NOVELLIE (L.). — An improved method of detecting sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 745, 1950.
- (60) OGUR (M.) et ROSEN (G.). — The nucleic Acids of plant tissues. *Arch. of Biochem.*, **25**, 262-276, 1950.
- (61) PANTANELLI (E.). — Beiträge zur Kenntniss der Ronckkrankheit oder Krautern der Rebe. *Zeit. Pflanzenkrankh.*, **22**, 1-38, 1912.
- (62) PARK (J. T.) et JOHNSON (M. T.). — Sub-microdetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **181**, 149-151, 1949.
- (63) PFANKUCH (E.) et HAGENGUTH (K.). — Isolierung einiger pflanzlicher Viren. *Naturwiss.*, **31**, 370-371, 1943.
- (64) PUGH (C. E. M.) et RAPER (H. S.). — Cités dans « Respiratory Enzymes », p. 4, par ELVEHJEM (C. A.). Burgess Publishing Company, 290 p., 1949.
- (65) PUGH (C. E. M.) et QUASTEL (J. H.). — Oxidation of aliphatic amines by brain and other tissues. *Biochem. J.*, **31**, 286-291, 1937.
- (66) RAPER (H. S.). — The tyrosinase-tyrosine reaction. Production from tyrosine of 5-6 dihydroxyindole and 5-6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid, the precursors of melanin. *Biochem. J.*, **21**, 89-91, 1927.
- (67) ROBERTS (E. A. H.) et WOOD (D. J.). — The polyphenols and amino-acids of Tobacco leaf. *Arch. of Biochem.*, **32**, 299-303, 1951.
- (68) ROBERTS (E. A. H.) et WOOD (D. J.). — A study of the polyphenols in Tea leaf by paper chromatography. *Biochem. J.*, **49**, 414-422, 1951.
- (69) RABIN (R. S.) et KLEIN (R. M.). — Chlorogenic Acid as a competitive inhibitor of indolacetic acid oxidase. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **70**, 11-15, 1957.
- (70) ROBINSON (G. M.) et ROBINSON (R.). — A survey of anthocyanins. *Biochem. J.*, **25**, 1687-1705, 1931.
- (71) SHIBATA (K.). — Die Enzymbildung in schrumpfkranke Maulbeer-bäumen. *Bot. Mag.*, **17**, 157-158, 1903.
- (72) SHIROYA (M.), SHIROYA (T.) et HATTORI (S.). — Studies on the browning and blackening of plant tissues. IV. Chlorogenic acid in the leaves of *Nicotiana Tabacum*. *Physiologia Plantarum*, **8**, 594-605, 1955.
- (73) SMITH (F. G.) et STOTZ (E.). — A colorimetric method for the determination of phenol oxidase in plant material. *J. Biol. Chem.*, **179**, 865-880, 1949.
- (74) SMITH (K. M.). — Recent advances in study of plant viruses. Churchill Ltd, London 327 pages 1951.

- (75) STANLEY (W. M.). — Isolation of a crystalline protein possessing the properties of Tobacco mosaic virus. *Science*, **81**, 644-645, 1935.
- (76) SUMNER (J. B.) et GJESSING (E. C.). — A method for the determination of peroxidase activity. *Arch. of Biochem.*, **2**, 291-293, 1943.
- (77) SUZUKI (U.). — Investigations on the Mulberry Dwarf troubles, a disease widely spread in Japan. *Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **4**, 267-288, 1902.
- (78) SUZUKI (U.). — Observation on the Mulberry Dwarf troubles (Schrumpfrkrankheit), a disease widely spread in Japan. *Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **4**, 359-360, 1902.
- (79) TAKAHASHI (W. N.). — Respiration of virus-infected plant tissue and effect of light on virus multiplication. *Amer. J. Bot.*, **34**, 496-500, 1947.
- (80) THIMANN (K. V.) et EDMONDSON (Y. H.). — The biogenesis of anthocyanins. I. General nutritional condition leading to anthocyanin formation. *Arch. of Biochem.*, **22**, 33-53, 1949.
- (81) THIMANN (K. V.), EDMONDSON (Y. H.) et RADNER (B. S.). — The biogenesis of anthocyanins. III. The role of sugars in anthocyanin formation. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **34**, 305-323, 1951.
- (82) THIMANN (K. V.) et RADNER (B. S.). — The biogenesis of anthocyanins. IV. The inhibitory effect of methionine and other sulfur containing compounds. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **58**, 424-497, 1955.
- (83) THIMANN (K. V.) et RADNER (B. S.). — The biogenesis of anthocyanins. V. Evidence for the mediation of pyrimidines in anthocyanin synthesis. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **59**, 511-525, 1955.
- (84) THUNG (T. H.). — Physiologisch Onderzoek met Betrekking tot het Virus der Bladrolziekte van de Aardoppelplant, *Solanum tuberosum* L. *Tijdschrift over Plantenziekten*, **34**, 1-74, 1928.
- (85) WHELDALE (M.). — On the direct Gaïacum reaction given by plant extract. *Proceed. of the Royal Soc., B* **84**, 121-124, 1912.
- (86) WHITEHEAD (T.). — On the respiration of healthy and leaf-roll infected potatoes. *Ann. Appl. Biol.*, **21**, 48-77, 1934.
- (87) WILDMANN (S. G.), CHEO (C. C.), BONNER (J.). — The protein of green leaves. III. Evidence of the formation of Tobacco mosaic virus protein at the expense of a main protein component in Tomato leaf cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, **180**, 985-1001, 1949.
- (88) WILLSTATTER (R.) et STOLL (A.). — Ueber Peroxydase. *Ann. d. Chemie*, **416**, 21-64, 1918.
- (89) WOODS (A.). — The destruction of chlorophyll by oxidizing enzymes. *Centralbl. f. Bakt. Parasitenkunde*, **5**, 745-754, 1899.
- (90) WOODS (A. F.). — Inhibiting action of oxidase upon diastase. *Science*, **11**, 17-19, 1900.
- (91) WOODS (A. F.). — Observations on the mosaic disease of Tobacco. *U. S. Departm. Agr. Bur. Plant Ind.*, **18**, 1-24, 1902.
- (92) WOODS (M. W.) et DU BUY (H. G.). — The effect of Tobacco mosaic virus on cellular respiration. *Phytopath.*, **32**, 288-312, 1942.
- (93) WYND (F. L.). — Certain enzymatic activities of normal and mosaic infected Tobacco plants. *J. Gen. Physiol.*, **25**, 649-661, 1942.
- (94) WYND (F. L.). — Metabolic phenomena associated with virus infection in plants. *Bot. Rev.*, **9**, 395-465, 1943.
- (95) WYND (F. L.). — Respiration of mosaic infected Tobacco plants. *Plant Physiol.*, **18**, 90-98, 1943.

36

II. — Identification de ces composés phénoliques.

A) Tabac.

1^o Acide chlorogénique.

2^o Acide isochlorogénique.

3^o Autre phénol : Composé n^o 1.

B) Pomme de terre.

— Vérification par chromatographie de la présence des trois phénols du Tabac.

— Mise en évidence de la rutine.

C) Dahlia.

— Acide chlorogénique.

— Autres phénols.

III. — Essai de dosage de l'acide chlorogénique.

1^o Recherche d'une méthode de dosage.

2^o Résultats.

— chez le Tabac.

— chez la Pomme de terre.

VII. — Mise en évidence et identification de corps fluorescents chez les plantes atteintes de maladies à virus. 53

Mise en évidence par chromatographie.

Isolement.

Identification. Scopoline.

Mise en évidence de l'action inhibitrice sur la croissance.

VIII. — Étude sur les pigments anthocyaniques. 57

1^o Introduction.

2^o Étude comparée de la synthèse des anthocyanes chez les Pommes de terre saines et malades.

1^o Nature du pigment.

2^o Dosage de la cyanidine dans les germes de Pommes de terre saines et malades.

3^o Conclusion.

IX. — Utilisation de l'anomalie de pigmentation pour un diagnostic pratique des maladies à virus de la pomme de terre. 62

X. — Résumé et conclusion. 64

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LES ANTHOCYANES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 5 juin 1958.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 30-7-1959

Dépôt légal: 3^e trimestre 1959

N^o d'impression: 248

